

**RESUMEN DE LA TESIS “METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN  
DE INGREDIENTES FUNCIONALES ANTIOXIDANTES. Efecto de Fibra  
Antioxidante de Uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular  
en humanos”**

**Autora:** Jara Pérez Jiménez

**Director:** Fulgencio Saura Calixto

El aumento de las enfermedades crónicas y degenerativas se ha convertido en un importante problema de salud en los países desarrollados. Las dietas ricas en frutas y verduras pueden prevenir estas enfermedades, debido a su contenido en diferentes compuestos bioactivos, como los antioxidantes.

Existen un amplio número de métodos para evaluar capacidad antioxidante *in vitro*, aunque todavía no existe un consenso sobre la combinación más adecuada de estos métodos para evaluar la capacidad antioxidante de una muestra. Igualmente, aunque existen marcadores del daño oxidativo a biomoléculas los resultados *in vivo* siguen siendo contradictorios.

Esta Tesis profundiza en el estudio de la metodología para evaluar ingredientes funcionales antioxidantes, considerando aspectos como el modo de extracción, posibles interferencias en los métodos más comunes y la expresión de resultados. Esta metodología se aplica a un posible ingrediente funcional, la Fibra Antioxidante de Uva. Este producto fue aplicado en distintos ensayos clínico, con el objeto de evaluar sus efectos en el status antioxidante y en parámetros de riesgo cardiovascular en humanos.

**Keywords.** Antioxidantes, biomarcadores, FRAP, ABTS, DPPH, ORAC, Fibra Antioxidante de Uva

**SUMMARY OF THE PhD THESIS “METHODOLOGY FOR THE EVALUATION OF ANTIOXIDANT FUNCTIONAL INGREDIENTES. Effect of the intake of Grape Antioxidant Dietary Fiber on antioxidant status and parameters of cardiovascular risk on humans”**

**Author:** Jara Pérez Jiménez

**Director:** Fulgencio Saura Calixto

The increase of chronic and degenerative diseases has become an important health problem in the developed countries. Diets rich in fruits and vegetables may prevent these diseases, due to their content of different bioactive compounds, such as antioxidants.

There is a wide spectrum of methods to evaluate *in vitro* antioxidant capacity, although there is not yet a consensus on the best combination of these methods to evaluate the antioxidant capacity of a foodstuff. Similarly, although there are biomarkers of oxidative damage to biomolecules, *in vivo* results are still contradictory.

This PhD Thesis deals on the study of the methodology to evaluate antioxidant functional ingredients, considering aspects such as the extraction procedure, possible interferences in the most common methods and the expression of results. This methodology is applied to a possible functional ingredient, Grape Antioxidant Dietary Fiber. This product was applied in several clinical trials, with the aim of evaluating its effects on antioxidant status and parameters of cardiovascular risk in humans.

Keywords: antioxidants, biomarkers, FRAP, ABTS, DPPH, ORAC, Grape Antioxidant Dietary Fiber



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS -DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA  
APLICADA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS**



**TESIS DOCTORAL**

**METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE  
INGREDIENTES FUNCIONALES ANTIOXIDANTES**

**Efecto de Fibra Antioxidante de Uva en status  
antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular  
en humanos**

**JARA PÉREZ JIMÉNEZ**

**Instituto del Frío (CSIC)  
Departamento de Metabolismo y Nutrición**

**Director: Dr. Fulgencio Saura Calixto**



## Agradecimientos

---

A mi director de tesis, el Dr. Fulgencio Saura-Calixto, por todo lo que me ha enseñado durante estos años, en los que ha sido un estímulo y apoyo constantes, tanto en la etapa experimental como en la de escritura. Por la confianza depositada en mí en numerosas ocasiones. Así mismo, por la ayuda que me prestó durante un complicado momento personal.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por haberme concedido una beca predoctoral I3P, financiada por el Fondo Social Europeo.

Al Dr. Dietmar Fuchs, de la Universidad Médica de Innsbruck (Austria), por haberme permitido realizar una estancia en su laboratorio.

A los Drs. Ian S. Young y Jane McEneny, de la Universidad Queen's de Belfast (Reino Unido), por haberme permitido realizar una estancia en su laboratorio, y a la acción europea COST-926, “Impact of new technologies on the health benefits and safety of bioactive plant compounds”, por haber financiado la misma

A la Dra. Isabel Goñi, de la Universidad Complutense de Madrid, por la ayuda prestada en los ensayos clínicos y durante todo el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Laura Jaime, de la Universidad Autónoma de Madrid, por haberme ayudado a introducirme en el mundo de la investigación.

Al Dr. Luis García Diz, de la Universidad Complutense de Madrid, por sus valiosos consejos sobre estadística.

A todos los voluntarios que participaron en los distintos ensayos clínicos, por su cooperación entusiasta y por su paciencia.

A los compañeros del Instituto del Frío, que han convertido estos años en inolvidables: Raquel, que consiguió volver de su exilio; Elena e Irene, que ya se han ido del laboratorio y a las que vamos a echar mucho de menos; Ana, a la que nunca le falta la sonrisa; Nacho, en su recta final; y mis compañeros del grupo, Lupita (la chava más chida), José (la paciencia en persona), M<sup>a</sup> Elena (que nos descubrió Trömsö, ¡y nosotros sin conocerlo!),

Sara (¿para cuándo un atracón de frutos secos?) y María ( la persona con más creatividad que conozco): no sabéis cuánto agradezco todo lo que me habéis ayudado.

Al resto del personal del Departamento, con los que he compartido muchos desayunos y cumpleaños: Sonia Ramos, Luis Goya, Laura Bravo, M<sup>a</sup> Ángeles Martín, Isabel Fernández-Conde, Antonio Jiménez, Pilar Rupérez y, en particular, a M<sup>a</sup> Rosa Redondo, por su apoyo técnico.

A Araceli, Jorge, Jordi, Juanjo, Lidia, Lolo, Miriam y Rubén, por haberme echado un cable.

Con todo el cariño, a mis padres, en especial por todos los sacrificios que han hecho por mí y por la ayuda prestada durante los complicados últimos meses.

A Manjón, por todo el amor, confianza y apoyo que es capaz de transmitirme; por hacer que cada día sea más maravilloso que el anterior.

*A Manjón*

*A mis padres*

*“Una sola cosa es la sabiduría: conocer con juicio verdadero cómo todas las cosas son gobernadas a través de todas las cosas”. HERÁCLITO*





# Índice

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>Pág. 1</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b>	<b>Pág. 3</b>
1.1 <i>El status antioxidante</i>	<i>Pág. 3</i>
1.2 <i>Antioxidantes endógenos</i>	<i>Pág. 7</i>
1.3 <i>Antioxidantes de la dieta</i>	<i>Pág. 8</i>
1.4 <i>Fuentes de antioxidantes en la dieta</i>	<i>Pág. 17</i>
1.5 <i>Metodología disponible para la determinación de capacidad antioxidante in vitro.</i>	<i>Pág. 19</i>
1.6 <i>Metodología disponible para la determinación de capacidad antioxidante in vivo.</i>	<i>Pág. 34</i>
1.7 <i>Biomarcadores para la determinación de daño oxidativo</i>	<i>Pág. 37</i>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>Pág. 51</b>
2.1 <i>Muestras</i>	<i>Pág. 51</i>
2.1.1 <i>Alimentos e ingredientes</i>	<i>Pág. 51</i>
2.1.2 <i>Muestras biológicas</i>	<i>Pág. 52</i>
2.2 <i>Métodos</i>	<i>Pág. 53</i>
2.2.1 <i>Ensayos in vitro</i>	<i>Pág. 53</i>
2.2.1.1 <i>Extracción de antioxidantes</i>	<i>Pág. 53</i>
2.2.1.1.1 <i>Extracción acuoso-orgánica</i>	
2.2.1.1.2 <i>Extracción fisiológica in vitro</i>	
2.2.1.2 <i>Determinación de compuestos antioxidantes</i>	<i>Pág. 56</i>
2.2.1.2.1 <i>Polifenoles extraíbles</i>	
2.2.1.2.2 <i>Taninos hidrolizables</i>	
2.2.1.2.3 <i>Taninos condensados</i>	
2.2.1.2.4 <i>Determinación de polifenoles por HPLC</i>	
2.2.1.3 <i>Determinación de capacidad antioxidante in vitro</i>	<i>Pág. 57</i>
2.2.1.3.1 <i>FRAP</i>	
2.2.1.3.2 <i>DPPH</i>	
2.2.1.3.3 <i>ORAC</i>	
2.2.1.3.4 <i>ABTS a un tiempo fijo</i>	
2.2.1.3.5 <i>ABTS expresado cinéticamente</i>	
2.2.1.4 <i>Otras determinaciones</i>	<i>Pág. 59</i>
2.2.1.4.1 <i>Fibra dietética</i>	
2.2.1.4.2 <i>Contenido en grasa</i>	
2.2.1.4.3 <i>Contenido en proteína</i>	
2.2.1.4.4 <i>Cenizas</i>	
2.2.1.5 <i>Estadística</i>	<i>Pág. 61</i>

2.2.2 Ensayos <i>in vivo</i>	Pág. 61
2.2.2.1 Diseño de los experimentos <i>in vivo</i>	Pág. 61
2.2.2.1 Efecto en fumadores de la Fibra Antioxidante de Uva	
2.2.2.2 Efectos en parámetros de riesgo cardiovascular de la Fibra Antioxidante de Uva	
2.2.2.2 Status antioxidante	Pág. 74
2.2.2.2.1 FRAP	
2.2.2.2.2 ABTS	
2.2.2.2.3 MDA	
2.2.2.2.4 Determinación de polifenoles totales en orina	
2.2.2.3 Marcadores de inflamación	Pág. 75
2.2.2.3.1 Fosfatasa alcalina	
2.2.2.3.2 Fibrinógeno	
2.2.2.3.3 Proteína C reactiva ultrasensible	
2.2.2.3.4 Homocisteína	
2.2.2.3.5 Neopterina	
2.2.2.4 Otros parámetros	Pág. 77
2.2.2.4.1 Estado nutricional	
2.2.2.4.2 Inmunología	
2.2.2.4.3 Glicemia	
2.2.2.4.4 Perfil lipídico	
2.2.2.4.5 Concentración de plaquetas	
2.2.2.4.6 Función hepática	
2.2.2.4.7 Presión arterial	
2.2.2.4.8 ácido úrico	
2.2.2.5 Evaluación dietética	Pág. 80
2.2.2.6 Medidas antropométricas	Pág. 80
2.2.2.7 Estadística	Pág. 80
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>Pág. 83</b>
3.1 Estudio de la capacidad antioxidante asociada a extractos acuoso-orgánicos	Pág. 83
3.1.1 Polifenoles y capacidad antioxidante asociada a los sobrenadantes	Pág. 85
3.1.2 Polifenoles y capacidad antioxidante asociada a los residuos	Pág. 91
3.2 Estudio de la capacidad antioxidante asociada a una extracción fisiológica <i>in vitro</i>	Pág. 94
3.2.1 Polifenoles y capacidad antioxidante asociada a los sobrenadantes	Pág. 95
3.2.2 Polifenoles y capacidad antioxidante asociada a los residuos	Pág. 98
3.3 Efecto del disolvente y de ciertos constituyentes de los alimentos en la determinación de capacidad antioxidante	Pág. 100
3.3.1 Efecto del disolvente	Pág. 102
3.3.2 Efecto de ciertos constituyentes de los alimentos	Pág. 106
3.3.3 Efecto combinado del disolvente y de ciertos constituyentes de los alimentos	Pág. 110

<i>3.4 Expresión cinética de los resultados del método ABTS de determinación de capacidad antioxidante.</i>	<i>Pág. 120</i>
3.4.1 Patrones de antioxidantes	<i>Pág. 122</i>
3.4.2 Comparación entre el ABTS y el DPPH	<i>Pág. 128</i>
3.4.3 Muestras ricas en antioxidantes	<i>Pág. 131</i>
 <i>3.5 Fibra Antioxidante de uva como ingrediente funcional</i>	 <i>Pág. 134</i>
 <i>3.6 Efecto en fumadores de la Fibra Antioxidante de Uva</i>	 <i>Pág. 138</i>
3.6.1 Efecto en parámetros bioquímicos	<i>Pág. 141</i>
3.6.2 Efecto en status antioxidante	<i>Pág. 146</i>
 <i>3.7 Efecto en parámetros de riesgo cardiovascular de la Fibra Antioxidante de Uva</i>	 <i>Pág. 151</i>
3.7.1 Evaluación dietética	<i>Pág. 163</i>
3.7.2 Estado nutricional	<i>Pág. 168</i>
3.7.3 Tránsito intestinal	<i>Pág. 170</i>
3.7.4 Antropometría	<i>Pág. 173</i>
3.7.5 Glucemia	<i>Pág. 175</i>
3.7.6 Perfil lipídico	<i>Pág. 177</i>
3.7.7 Recuento de plaquetas	<i>Pág. 185</i>
3.7.8 Tensión arterial	<i>Pág. 187</i>
3.7.9 Marcadores de inflamación	<i>Pág. 190</i>
3.7.10 Status antioxidante	<i>Pág. 193</i>
3.7.11 Valoración del producto por los voluntarios	<i>Pág. 205</i>
 <b>4. CONCLUSIONES</b>	 <b>Pág. 209</b>
 <b>5. BIBLIOGRAFÍA</b>	 <b>Pág. 211</b>
 <b>6. APÉNDICE</b>	 <b>Pág. 233</b>
Reactivos	<i>Pág. 233</i>
Equipos	<i>Pág. 236</i>
Abreviaturas	<i>Pág. 237</i>
Índice de figuras	<i>Pág. 239</i>
Índice de tablas	<i>Pág. 241</i>
Publicaciones y trabajos presentados en congresos	<i>Pág. 243</i>



# INTRODUCCIÓN



El aumento de las enfermedades crónicas y degenerativas se ha convertido en uno de los principales problemas de salud en los países desarrollados. Esto ha provocado un aumento del interés por investigar posibles factores preventivos de estos procesos.

En este sentido, se ha comprobado epidemiológicamente que las dietas ricas en frutas y verduras y, en particular, la dieta Mediterránea, pueden prevenir el desarrollo de estas enfermedades, debido a la presencia en dichos alimentos de diferentes compuestos bioactivos.

Entre estos compuestos bioactivos se encontrarían los antioxidantes, un amplio grupo de compuestos capaces de prevenir los procesos degenerativos asociados a un exceso de radicales libres en el organismo. En las últimas dos décadas, se han desarrollado un amplio número de métodos para evaluar, tanto la capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de alimentos, como los efectos *in vivo* de la suplementación con antioxidantes.

Sin embargo, aun partiendo del hecho de que los antioxidantes actúan en modo sinérgico y, por tanto, es necesario más de un método para evaluar la capacidad antioxidante de una muestra, todavía no existe un consenso sobre cuál sería la combinación más adecuada para efectuar estas medidas, ni sobre los procedimientos de preparación de la muestra, lo que lleva a una gran disparidad de técnicas empleadas en los resultados publicados y, por tanto, a la dificultad de comparar resultados entre sí.

En los ensayos *in vivo*, los resultados siguen siendo contradictorios. Así, aunque se han desarrollado marcadores específicos del daño oxidativo a biomoléculas, en numerosos ensayos de suplementación con antioxidantes no se encuentran cambios en los mismos, pero sí en otras medidas indirectas, que se habrían modificado fruto de dicha suplementación, como puede ser el perfil lipídico plasmático.

Nuestro grupo ha venido desarrollando un trabajo en los últimos años profundizando en el conocimiento y aplicación de distintos métodos de medida de capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo*, así como en aspectos referentes a la preparación de la muestra.



Los objetivos de esta Tesis son:

- Profundizar en el conocimiento de la metodología para la selección de ingrediente funcionales de alta capacidad antioxidante. Para ello, se considerarán aspectos referentes a la preparación de la muestra (distintos procedimientos de extracción; aporte de capacidad antioxidante de los residuos de los extractos, habitualmente no considerados) y a posibles interferencias en los métodos de determinación de capacidad antioxidante (efecto del disolvente, de compuestos no antioxidantes que pueden afectar a los resultados, efecto combinado de ambos). Así mismo, se pretende introducir una modificación en el método ABTS, uno de los más comunes en la medida de capacidad antioxidante, con el objetivo de determinar parámetros cinéticos, que proporcionan una información más completa sobre el comportamiento de la muestra.

- Aplicar esta metodología para la posible selección de un ingrediente funcional previamente desarrollado por nuestro grupo, la Fibra Antioxidante de Uva.

- Evaluar los efectos en fumadores y en parámetros de riesgo cardiovascular en sujetos normo- e hipercolesterolémicos de la ingesta de Fibra Antioxidante de Uva. Discutir los parámetros más adecuados para establecer los efectos de una suplementación de este tipo.

Los estudios realizados en esta memoria se engloban dentro de los siguientes proyectos:

- Proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia AGL-2002-04104. “Efecto de fibra dietética de uva sobre el status antioxidante de fumadores como población de riesgo”

- Proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia AGL-2004-2004-07579-C04-01/ALI “Establecimiento de bases científicas para el uso de fibra dietética antioxidante y fracciones polifenolicas de uva en la prevención de cancer colorrectal”

- Acción europea COST-926 “Impact of new technologies on the health benefits and safety of biactive plant compounds”

## **1. ANTECEDENTES**



## **1.1 EL STATUS ANTIOXIDANTE**

Un radical libre es una especie química con uno o más electrones desapareados en un nivel energético superior, con capacidad de existencia independiente y con propiedades paramagnéticas, lo que le confiere una alta e indiscriminada radiactividad (Halliwell et al., 1995; González San José et al., 2001) En el organismo, estos radicales libres, pueden tener un origen endógeno o exógeno.

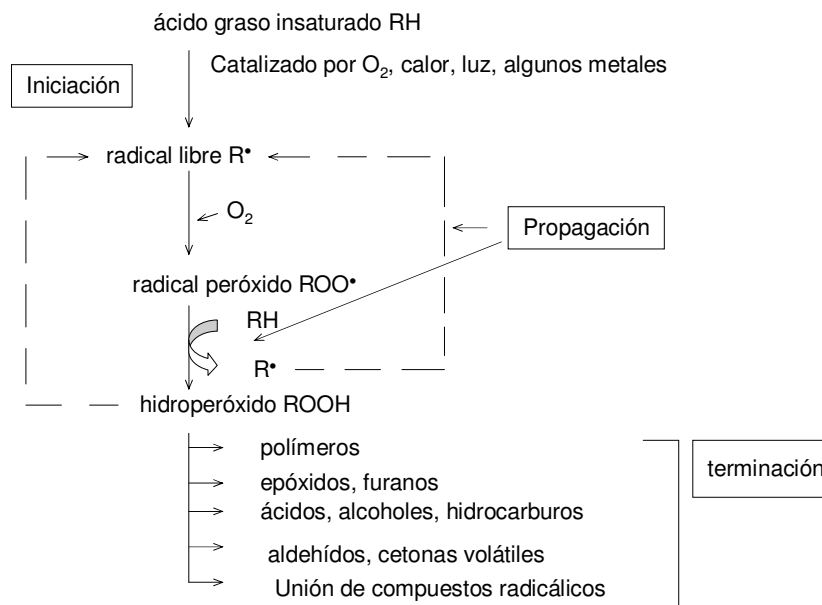
Las fuentes endógenas pueden ser varias (González, Muñiz y Valls, 2001):

- La cadena respiratoria, donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a distintas especies radicálicas.
- Las células fagocitarias (monocitos, neutrófilos, macrófagos), que utilizan el sistema de la NADPH oxidasa, generando directamente ion superóxido ( $O_2^-$ ). Por otra parte, estas células también sintetizan óxido de nitrógeno como mecanismo de defensa, compuesto que reacciona con el ion superóxido para generar peroxinitrito, capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas.
- La autooxidación de compuestos de carbono reducidos, como aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos.
- La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa, ciclooxigenasa o lipoxigenasa.

Las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser la exposición a ciertas radiaciones (radiaciones electromagnéticas, luz solar, ozono), componentes de los cigarrillos, ciertos aditivos alimentarios, etc.

Pequeñas cantidades de ROS son necesarias para ciertos procesos fisiológicos, como el sistema de señales intracelulares, la inmunidad y la defensa contra microorganismos. Sin embargo, cuando existe un exceso de radicales libres estos pueden atacar lípidos (tanto ácidos grasos poliinsaturados de membrana como colesterol) proteínas y ADN (ácido desoxirribonucleico), ciertos tipos de hidratos de carbono, como interleukinas o

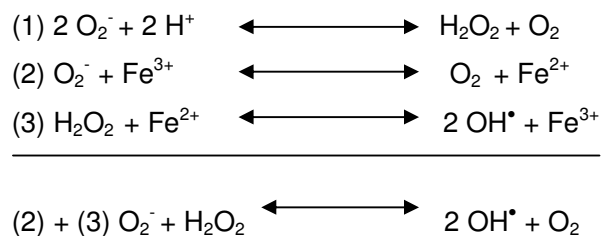
neurotransmisores, dando lugar a reacciones en cadena, en las que se generan nuevos radicales libres y toda una serie de nuevos compuestos, como carbonilos, aldehídos, etc. La **Figura 1** muestra de manera esquemática la oxidación de ácidos grasos insaturados por radicales libres, catalizada por  $O_2$ , calor, luz y algunos metales.



**Figura 1.** Esquema de la oxidación de ácidos grasos insaturados

Además de los radicales libres que aparecen en la anterior figura, en el organismo existen otras especies reactivas de oxígeno (ROS), como el ion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), el alcóxido ( $RO^{\bullet}$ ) y el oxígeno singlete. Aunque el oxígeno singlete no es un radical y en este caso no se produce una reacción por vía radicalica, experimenta una reacción por adición de dobles enlaces, formando endoperóxidos que pueden ser reducidos a radicales alcoxilo, iniciando estas reacciones de cadena radicalicas. También existen especies reactivas con N, como el peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ), formado por la reacción entre el óxido nítrico y el superóxido o el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) y con Cl, como el triclorometilo ( $CCl_3^{\bullet}$ ) (Prior, Wu & Schaich, 2005; Sánchez-Moreno, 2002).

Se debe señalar también que, en el organismo, el ion superóxido actúa como el mayor reductor. Por reacción con protones da lugar a peróxido de hidrógeno, un potente oxidante que reacciona con la mayoría de las moléculas, especialmente con las que contienen SH o Fe-sulfuro. También reacciona con metales de transición dando lugar al radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), según las reacciones de Fenton y Haber-Weiss:



Por otro lado, la reactividad de un radical libre puede ser estimada a partir de la energía de disociación necesaria para sustraer el átomo de hidrógeno de la cadena carbonada. Esto hace que, por ejemplo, el radical hidroxilo sea más reactivo que el peroxilo y pueda atacar cualquier átomo de hidrógeno de una molécula lipídica, mientras que el radical peroxilo sólo ataca átomos de hidrógeno de dobles enlaces y será más fácil que lo haga cuantos más dobles enlaces haya en la cadena carbonada. Por esta razón, los ácidos grasos poliinsaturados son más sensibles a la oxidación que los monoinsaturados y, por supuesto, que los saturados.

Los radicales libres están íntimamente relacionados con la salud, ya que los compuestos generados en este proceso de oxidación de biomoléculas se han relacionado con una gran cantidad de enfermedades, fundamentalmente procesos degenerativos, como la enfermedad cardiovascular, ciertos tipos de cáncer (debido a las mutaciones que producen en el ADN y a que favorecen la proliferación celular al alterar factores de transcripción), patologías asociadas a un deterioro del sistema cognitivo, como el Alzheimer, etc. (Halliwell, 1997; De la Fuente, 2002; Stanner, Hughes & Buttriss, 2004)

En particular, existe una estrecha relación entre inflamación y enfermedad cardiovascular, relación que aparece de manera clara en las primeras etapas de desarrollo de la aterosclerosis, cuando los radicales libres oxidan las LDLs, generando radicales peroxi, que continúan con el proceso oxidativo y produciendo modificaciones en la apolipoproteína B, que la convierten en un ligando para monocitos y células T. Los monocitos ingieren las LDLs oxidadas, dando lugar a las células espumosas características de las etapas iniciales de esta patología. Además, bajo condiciones de estrés oxidativo, las células espumosas liberan sus contenidos tóxicos, lo que estimula la respuesta inflamatoria y provoca la migración de neutrófilos y macrófagos adicionales, continuando con el proceso.

Frente a estas sustancias prooxidantes y sus efectos adversos, un antioxidante puede ser definido como una sustancia que, cuando se encuentra a bajas concentraciones comparadas con las del sustrato oxidable, previene o retrasa que un prooxidante oxide el sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1989). El interés por estos compuestos ha hecho que, entre

los años 1993 y 2003, el número de publicaciones sobre antioxidantes y estrés oxidativo haya pasado de 1684 a 6510 (Huang, Ou & Prior, 2005)

A continuación se enumeran los principales antioxidantes conocidos, que pueden tener un origen tanto endógeno como dietético. Del equilibrio entre moléculas oxidantes y antioxidantes dependerá que prevalezca un estado saludable o de enfermedad.

## **1.2 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS**

En el organismo existen antioxidantes endógenos que evitan las reacciones en cadena que generan los radicales libres. Se pueden clasificar en las siguientes categorías (Aruoma, 1999; Aruoma, 2003):

- Sistemas enzimáticos capaces de inhibir a los ROS. Superóxido dismutasa (SOD), que elimina el anión superóxido mediante su conversión a peróxido de hidrógeno. Las células humanas poseen una enzima SOD en la mitocondria con manganeso en su centro activo, y una enzima SOD con zinc y cobre en su centro activo, presente en mayor cantidad en el citosol.

- Enzimas capaces de descomponer ciertos intermediarios de la oxidación no radicálicos:

- Catalasas presentes en los peroxisomas, que transforman el peróxido de hidrógeno en  $H_2O$  y  $O_2$ .

- Glutation peroxidasa (GSHPX), que requiere selenio en su centro activo y que elimina el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos, transformando el glutatión reducido o GSH en glutatión oxidado o GSSG.

- Glutation reductasa, que regenera el GSH desde el GSSG, con NADPH como fuente de poder reductor.

La actividad de las enzimas antioxidantes en el hígado se reduce como consecuencia de situaciones que aumenten el estrés oxidativo, como el alcohol, y se ha visto incrementada fruto de la ingesta de polifenoles, aunque los resultados en este sentido no han sido concluyentes.

- Sistemas no enzimáticos, como ciertas moléculas capaces de quelar metales – transferrina, lactoferrina, hemopoxina, ceruloplasmina, etc.



### **1.3 ANTIOXIDANTES DE LA DIETA**

Numerosos trabajos han demostrado la existencia de una correlación entre el consumo de una dieta rica en alimentos de origen vegetal con un menor riesgo de desarrollar ciertas enfermedades, como enfermedades cardiovasculares, procesos degenerativos relacionados con la edad como el Alzheimer, procesos inflamatorios, ciertos tipos de cáncer, etc. (Halliwell 1997 ;De la Fuente, 2002; Stanner, 2004) En particular, la dieta tipo Mediterránea, caracterizada precisamente por un alto consumo de alimentos vegetales, se ha correlacionado con una reducción en el riesgo, por ejemplo, de enfermedades cardiovasculares ( Vicent-Baudry et al., 2005) y de la mortalidad total, por enfermedades cardiovasculares y por ciertos tipos de cáncer (Trichopoulou et al., 2004)

Entre otros compuestos bioactivos, los alimentos vegetales son ricos en antioxidantes, que incluyen distintos grupos de compuestos de naturaleza química diversa que se describen a continuación.

Estos compuestos pueden actuar como antioxidantes primarios, reaccionando directamente con los radicales libres -en cuyo caso suelen dar lugar a un nuevo radical, menos reactivo que el radical libre original-, o como antioxidantes secundarios, potenciando otros sistemas antioxidantes, como ciertas enzimas.

#### **1.3.1 Vitamina C o ácido ascórbico**

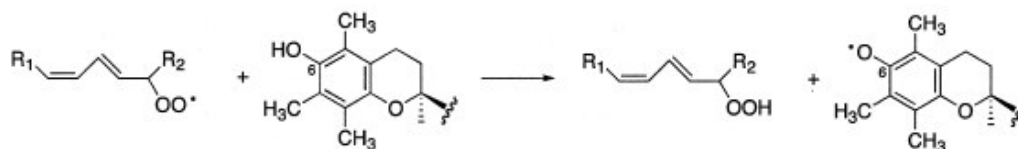
Es un compuesto hidrosoluble, cuya capacidad para actuar como antioxidante se debe a que al reaccionar con radicales libres, fundamentalmente radicales peroxilo, los neutraliza y se transforma en el radical dehidroascorbato, mucho menos reactivo que los radicales libres que existían previamente. Existen sistemas enzimáticos intracelulares para regenerar este radical de dehidroascorbato a su forma original, usando como poder reductor NADH (en el caso de la NADH- semidehidroascorbato reductasa) o GSH (en el caso de la dehidroascorbato reductasa) (Aruoma, 1999)

Por otro lado, actúa sinérgicamente con el tocoferol para regenerar los radicales tocoferil. También puede inhibir la citotoxicidad inducida por oxidantes. Además, puede prevenir o reducir la peroxidación lipídica inducida por  $H_2O_2$  y la formación de OH-deoxiguanosina, producida como consecuencia de la oxidación del ADN (Yen, Duh & Tsai, 2002)

Hay que tener en cuenta que las mezclas de ascorbato de hierro y de cobre - presentes en muchos complementos vitamínicos- estimulan el daño de radicales libres al ADN, lípidos y proteínas *in vitro*. Así mismo, estas mezclas pueden inactivar rápidamente distintas enzimas antioxidantes, como la catalasa (Metin Donma & Donma, 2005)

### 1.3.2 Vitamina E o $\alpha$ -tocoferol

Se trata de un compuesto de naturaleza lipofílica, con capacidad para reaccionar con radicales peroxilo (Aruoma, 1999). Mediante esta reacción se genera un nuevo radical, mucho más estable que el que había inicialmente debido a la existencia de un anillo aromático, así como a influencias estéricas y electrónicas de los sustituyentes metilo (Hensley, 2004). Dicha reacción aparece en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Reacción del  $\alpha$ -tocoferol con un radical peroxilo

Por esta capacidad para evitar la propagación de la oxidación lipídica, juega un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular.

Por otro lado, se ha observado que la vitamina E puede modular la transcripción de genes que codifican enzimas implicadas en el mantenimiento del status antioxidante y procesos relacionados (SOD, NO sintasa, ciclooxigenasa-2) y/o la actividad de dichas enzimas (Tucker & Townsend, 2005)

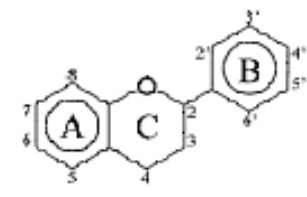
En cualquier caso, las vitaminas antioxidantes también pueden convertirse en prooxidantes en función de las dosis, la frecuencia de ingesta y los tejidos diana. Así, se han sugerido efectos prooxidantes de la vitamina E en fumadores (Metin Donma & Donma, 2005)

### 1.3.3 Polifenoles

Se trata de un amplio grupo de compuestos producto del metabolismo secundario de las plantas, que desempeñan en éstas diversas funciones, tales como proteger del ataque de patógenos o herbívoros, o ser pigmentos que ayudan a atraer a los polinizadores. Poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante. Suelen aparecer en formas conjugadas, con uno o más restos azúcar unidos al grupo hidroxilo o directamente al anillo aromático, aunque también se pueden asociar a otros compuestos.

Los polifenoles alimentarios se pueden clasificar en dos grupos: extraíbles y no extraíbles. Los extraíbles son compuestos de pesos moleculares bajos o medios que se pueden extraer empleando diferentes disolventes acuosos y acuoso-orgánicos. Los no extraíbles son compuestos con un elevado peso molecular, o polifenoles unidos a fibra dietética o proteínas que se pueden encontrar en los residuos de las extracciones (Bravo, Mañas & Saura-Calixto 1993; Bravo, Abia & Saura-Calixto 1994)

Por lo que se refiere a los polifenoles extraíbles, se pueden clasificar, en función de su estructura química, en ácidos fenólicos, estructuras simples (y que pueden aparecer libres, como el cafeico, el ferúlico, el p-cumárico y el sináptico, o esterificados, como el clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico) y flavonoides, estructuras mucho más complejas, que a su vez se subdividen en flavonas (crisina, rutina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavanoles o catequinas (epicatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina), flavanonas (hesperidina, naringenina), antocianinas (delfinidina, malvidina, cianidina), taninos condensados con un número bajo de monómeros, etc. Los flavonoides se forman a partir de fenilalanina, tirosina y grupos acetato. La **Figura XX** muestra la estructura general de los flavonoides, con tres anillos unidos.



**Figura 3.** Estructura general de un flavonoide

Los grupos de flavonoides más extendidos son las flavonas y los flavonoles. Los flavonoles forman O-glucósidos, pero las flavonas pueden formar O-glucósidos y C-

glucósidos, que no se pueden romper por hidrólisis ácida, a diferencia de los O-glucósidos. Lo mismo ocurre con las flavanonas (Bravo, 1998)

Los polifenoles no extraíbles incluyen taninos hidrolizables y taninos condensados con un elevado número de unidades en la cadena polimérica. Los taninos hidrolizables son estructuras poliméricas que pueden derivar del ácido gálico o de su producto dimérico de condensación, el ácido hexahidroxidifénico.

Los taninos condensados o proantocianidinas, por su parte, son estructuras poliméricas, formadas por la unión de flavan-3-oles, y pueden ser: procianidinas, con una sustitución 3,4-dihidroxi en el anillo B (sólo están formadas por unidades de epicatequina); prodelfinidinas, con una sustitución 3,4,5-trihidroxi en el anillo B; propelargonidinas, con una sustitución 4-hidroxi en el anillo B, aunque éstas últimas son mucho menos frecuentes en alimentos. Los carbonos 2,3 y 4 del anillo B son asimétricos y pueden aparecer con diferentes configuraciones. Generalmente, las uniones se producen entre el C4 de la unidad superior y el C6 o el C8 de la unidad inferior, aunque en ocasiones puede aparecer otro enlace entre el C2 de la unidad superior y el C5 o el C7 de la inferior. Además, las unidades de flavonoles pueden llevar sustituyentes acilos o glucosilos, y uno de los más frecuentes sustituyentes acilo es el ácido gálico, que forma un enlace éster con el grupo hidroxilo en la posición C3 (Santos-Buelga & Scalbert, 2000)

En cuanto al modo de acción de los polifenoles, los grupos OH del anillo B pueden donar un hidrógeno y un electrón a radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito, estabilizándolos y transformándose el flavonoide en una molécula radicalica relativamente estable (Heim et al., 2002) También son capaces de quelar metales, formando complejos que, aun así, mantienen la capacidad antioxidante. En cualquier caso, éste sería un efecto adverso en personas con deficiencias crónicas de algunos metales (Heim et al., 2002) Finalmente, algunos polifenoles, además de su propia acción antioxidante, pueden potenciar las actividades de enzimas antioxidantes, como la genisteína, una isoflavona que potencia la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la SOD (Metin Donma & Donma, 2005)

La estructura de los polifenoles determina su capacidad antioxidante, lo que ha provocado que se hayan publicado un gran número de trabajos estudiando este aspecto (Rice-Evans et al., 1996; Villaño et al., 2005; Siquet et al., 2006). De manera general, se puede señalar que la presencia de sustituyentes hidroxilo aumenta la capacidad antioxidante. En el caso de los flavonoles, la mayor capacidad antioxidante se produce con

una estructura orto-dihidroxi en el anillo B y un OH en la posición 3, un doble enlace 2,3 y una función oxo en el C4, lo que ocurre con la quercetina. Por otro lado, la glucosilación de los flavonoides reduce su capacidad antioxidante en relación a las correspondientes agliconas.

Por otro lado, algunos autores han señalado el hecho de que, dado que a pH fisiológico algunos de los grupos fisiológicos de los polifenoles pueden estar desprotonados, lo que reduciría la capacidad antioxidante respecto a la forma protonada (Lemanska et al., 2001)

En lo que se refiere a los taninos condensados, no hay resultados concluyentes sobre el efecto que puede tener el número de monómeros en la cadena sobre la capacidad antioxidante del compuesto (Santos-Buelga & Scalbert, 2000)

En cualquier caso, siempre hay que tener en cuenta el tipo de medio en el que actuarán los antioxidantes como punto de partida para definir su acción; así, se ha observado en ensayos en liposomas que los ácidos dihidroxifenólicos son más antioxidantes que los trihidroxifenólicos, al contrario de lo que ocurre en medio acuoso, debido a sus mayores coeficientes de partición. Igualmente, en este medio parece ser que el sustituyente del anillo fenólico tiene una importancia menor que en el medio acuoso (Siquet et al., 2006)

Igualmente, se debe considerar que estructuras polifenólicas que presentan una mayor capacidad antioxidante *in vitro*, no necesariamente la tendrán *in vivo*; así, un reciente estudio demostró que ciertos polifenoles metilados, que *in vitro* presentan una capacidad antioxidante muy inferior a la de sus formas no metiladas, mostraban después una mayor capacidad para proteger a cultivos celulares de la toxicidad inducida por peróxido de hidrógeno (Deng et al., 2006) De la misma manera, los compuestos fenólicos más abundantes en los alimentos no son necesariamente los más absorbidos; el ácido gálico, por ejemplo, presente en general en concentraciones mucho más bajas que otros polifenoles, es uno de los que presenta mayores tasas de absorción.

Precisamente, el metabolismo de los polifenoles, las tasas de absorción y las posibilidades de que puedan ejercer sus efectos antioxidantes *in vivo* tras ser absorbidos, han sido también profusamente estudiados. Los glucósidos de flavonoides son absorbidos en el intestino tras degradarse, dado lugar a las agliconas, que van al hígado, donde experimentan procesos de metilación, sulfatación y glucuronidación, y de ahí pasan a la sangre, dependiendo del compuesto en cuestión el tiempo necesario para alcanzar máximos

en sangre, y estando entre 30 minutos y 9 horas. El grado de glicosilación influye en la absorción intestinal.

Por lo que se refiere al resto de los compuestos polifenólicos, en general no absorbidos, se debería tener en cuenta, en primer lugar, que podrían tener un efecto a nivel local en el tracto gastrointestinal. Esto es importante, dado que el tracto gastrointestinal está continuamente expuesto a la acción de los radicales libres. Por ejemplo, en el estómago se producen mezclas de ácido ascórbico y hierro, dando lugar a una combinación prooxidante; aparecen peróxidos lipídicos, aldehídos citotóxicos e isoprostanos de la dieta, y en el intestino se activan células inmunes debido a toxinas de los alimentos (Valls Bellés, 2005)

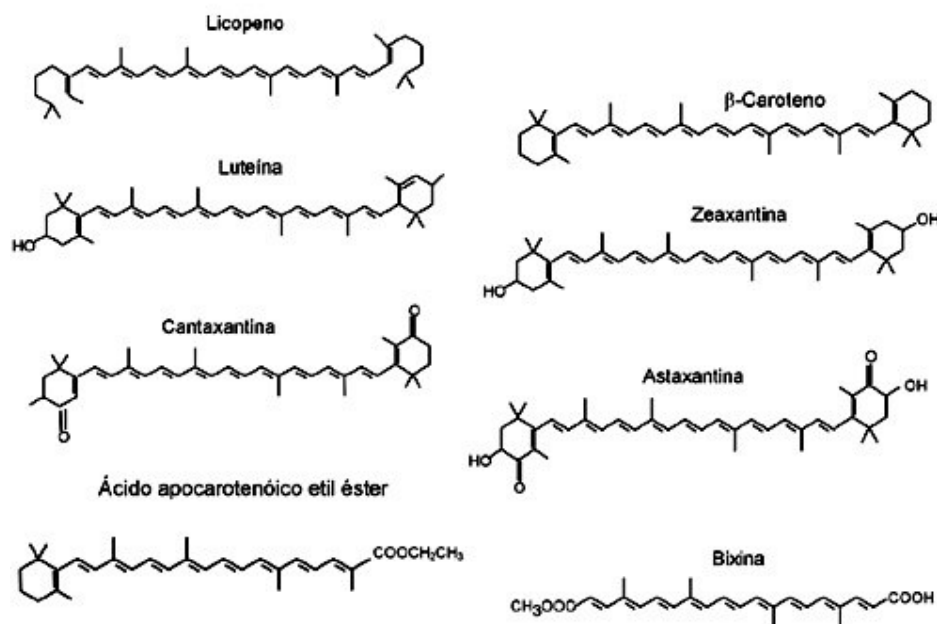
Así mismo, parece ser que parte de los polifenoles que llegan intactos al intestino grueso son fermentados por la microflora intestinal, proporcionando un medio ambiente antioxidante en el colon y pasando después los productos obtenidos a través de la vena porta hasta el hígado, donde serían metabolizados (Santos-Buelga & Scalbert, 2000; Heim et al., 2002)

En cualquier caso, se debe también indicar que muchos polifenoles con estructuras oligo- o poliméricas, que durante mucho tiempo se habían considerado no disponibles en el intestino delgado, han mostrado ciertas tasas de absorción en diversos estudios. Así, aunque los oligómeros de procianidinas no pueden ser absorbidos como tales, los jugos gástricos los descomponen en monómeros de epicatequina y unidades diméricas y oligoméricas que sí pueden ser absorbidas (Spencer et al., 2000), y en pruebas de digestión *in vitro* se ha observado que un pequeño porcentaje de los taninos condensados pueden ser hidrolizados por las enzimas del tracto gastrointestinal, de los que a su vez en torno a la mitad podrían ser absorbidos en el intestino delgado (Serrano, 2005)

Finalmente, no hay que olvidar que se han indicado posibles efectos prooxidantes de ciertos polifenoles. Se han descrito efectos cromosómicos inducidos por las isoflavonas de la soja, así como que potencian carcinógenos químicos y que ejercen efectos negativos en la función cognitiva de los ancianos (Metin Donma & Donma, 2005). Por lo que, al igual que ocurre con otros compuestos antioxidantes, la ingesta de polifenoles se debe mantener dentro de unos rangos para que sus posibles efectos beneficiosos no se transformen en negativos para la salud.

### 1.3.4 Carotenoides

Son pigmentos naturales, tetraterpenoides sintetizados en plantas y otros organismos fotosintéticos, así como en algunas bacterias no fotosintéticas y levaduras. La mayoría de los carotenoides están formados por una cadena central de átomos de carbono con enlaces sencillos y dobles alternados y con diferentes grupos cíclicos o acíclicos. Los carotenos sólo tienen átomos de carbono e hidrógeno, mientras que las xantofilas también contienen átomos de nitrógeno. La **Figura 4** muestra las estructuras químicas de algunos carotenoides.



**Figura 4.** Estructuras químicas de algunos carotenoides.

Se conocen unos 600 carotenoides, aunque sólo 19 han sido detectados en distintos tejidos humanos (El- Agamey et al., 2004)

Los carotenoides pueden captar radicales peroxilo, mediante transferencia de electrones o sustracción de átomos de hidrógeno, mecanismos que llevan a la formación de una gran variedad de carotenoides radicálicos. De hecho, en función de la posición que ocupe el carotenoide en la membrana lipídica, estando orientando hacia la fase acuosa o hacia la orgánica, en la reacción de un mismo carotenoide con un mismo radical libre se pueden generar diferentes productos (El-Agamey et al., 2004). Por otro lado, los carotenoides pueden captar captar oxígeno singlete, algo que no pueden hacer los polifenoles. Su capacidad de captación dependerá del número de dobles enlaces presentes

en la cadena carbonada. También pueden presentar efectos sinérgicos con otros antioxidantes, como la vitamina E (Stahl & Sies, 2006) o la C (El-Agamey et al., 2004)

Su absorción va paralela a la de los lípidos, sufriendo el proceso de emulsificación e incorporación en micelas que, por difusión pasiva, entran en los enterocitos. Desde allí, son transportados a los tejidos, donde se incorporan en los quilomicrones y son transportados a la circulación vía sistema linfático (Valls Bellés et al., 2005) Su absorción es mayor cuando se encuentran en frutos de color anaranjado, donde están presentes como gotas de aceite, que cuando están en hojas verdes, donde forman parte de estructuras fotosintéticas (De Pee et al., 1998)

A pesar de que su capacidad antioxidante está demostrada, los estudios *in vivo* con  $\beta$ -caroteno han dado resultados contradictorios. Así mismo, se han observado niveles significativamente más altos de este compuesto en el cáncer de mama, colon, tiroides y renal; también se han observado niveles más elevados de licopeno, otro carotenoide, en cáncer de boca respecto a controles. Por otro lado, en presencia del humo del tabaco, el  $\beta$ -caroteno se puede transformar de antioxidante en prooxidante (Metin Donma & Donma, 2005)

### **1.3.5 Compuestos de Maillard**

La reacción de Maillard consta de tres etapas: una primera, en la que se produce la condensación entre un compuesto carbonílico y un grupo amino en medio ácido, a partir de la cual se generan una serie de compuestos denominados de Amadori. En la segunda etapa, estos compuestos se descompondrían, dando lugar a moléculas volátiles y no volátiles de bajo peso molecular. En la tercera etapa, muchos de los compuestos formados durante la etapa intermedia, como derivados enaminoles, análogos de azúcar de bajo peso molecular y productos carbonílicos insaturados sufren reacciones de polimerización, dando lugar a los compuestos conocidos como melanoidinas (Valls Bellés et al., 2005)

Se ha descrito la capacidad antioxidante de algunos de estos compuestos (Morales, 2002), especialmente cuando el aminoácido que reacciona con el azúcar es histidina o cisteína. Estarían presentes en alimentos con un contenido en azúcares libres y proteínas y que son sometidos a tratamientos térmicos, como pueden ser el café (Borrelli et al., 2004; Sánchez-González, Jiménez-Escrig & Saura-Calixto, 2005) o el pan (Ramírez-Jiménez, 2000; Borrelli, 2003).



Aunque su metabolismo es en general poco conocido, se sabe que se absorben a través del tracto gastrointestinal por difusión y son captados por riñón, hígado y músculo, eliminándose a través de la orina (Valls Bellés et al., 2005)

## 1.4 FUENTES DE ANTIOXIDANTES EN LA DIETA

Como se ha explicado, los antioxidantes de la dieta abarcan un amplio número de compuestos. En un gran número de alimentos vegetales, se ha evaluado el contenido en distintos antioxidantes concretos y se han determinado las principales fuentes de los mismos. A modo de ejemplo, la **Tabla 1** muestra los alimentos más ricos en diferentes polifenoles.

**Tabla 1.** Alimentos ricos en distintos polifenoles

Grupo de compuestos	Compuesto	Alimentos
Flavanoles	Epigallocatequina	Té verde y té negro
Flavanonas	Naringinina	Piel de cítricos
	Taxifolina	Cítricos
	Hesperidina	Naranja
Flavonoles	Kaempferol	Endivia, brócoli y té negro
	Quercetina	Cebolla, lechuga, brócoli, aceituna, té, vino tinto, arándanos
Flavonas	Miricetina	Arándanos, uvas, vino tinto
	Crisina	Piel de frutas
	Apigenina	Puerro
	Rutina	Piel de tomate, vino tinto
	Luteolina	Pimiento rojo
Ácidos fenólicos	Ácido fenólico	Trigo, maíz, tomate, espinacas, espárragos
	Ácido cafeico	Uvas blancas, vino blanco, tomate, espinacas, espárragos
	Ácido gálico	Té
	Ácido clorogénico	Manzana, pera, cereza, ciruela, melocotón, albaricoque, tomate
Antocianidinas	Malvidina	Uvas tintas, vino tinto
	Cianidina	Cerezas, fresas, frambuesas, uvas

Fuente: Rice-Evans et al., 1996; Valls-Bellés et al., 2005

No obstante, se debe señalar que, aunque ciertos alimentos puedan presentar un contenido apreciable en antioxidantes, si su ingesta es escasa, el aporte de ese alimento a la capacidad antioxidante total de la dieta será inferior al de otros alimentos con menor

contenido en antioxidantes, pero más consumidos. En ese sentido, se debe destacar el enfoque novedoso de nuestro grupo al determinar la capacidad antioxidante de la dieta española, considerando diferentes grupos de alimentos vegetales en la proporción en la que son consumidos (Saura-Calixto & Goñi, 2006). En este trabajo se observó que la mayor parte de esta capacidad antioxidante proviene de las bebidas, que aportan más del 50%, mientras que, por ejemplo, el aceite de oliva, un alimento rico en antioxidantes, aporta menos del 1% del total.

De la misma manera, resulta destacable un estudio prospectivo con 22.00 individuos realizado por Trichopoulou y colaboradores (2003), en el que se determinó que la dieta Mediteránea previene la mortalidad total, por cáncer y por enfermedades cardiovasculares, pero que ninguno de los alimentos constituyentes de dicha dieta se puede relacionar aisladamente con dichos efectos.

Por tanto, de manera global se deberían recomendar dietas ricas en antioxidantes más allá de consumos aislados de un cierto alimento. No obstante, es también necesario indicar que en sujetos de riesgo o con ciertas enfermedades en las que los antioxidantes pueden jugar un efecto beneficiosos, sí se podría enfatizar el consumo de alimentos específicos o de suplementos dietéticos, que podrían suponer un aporte extra (considerando siempre que el aporte de antioxidantes que se esté efectuando no suponga una dosis suprafisiológica tal que estos compuestos se transformen en prooxidantes). En este sentido, durante los últimos se han desarrollado numerosas investigaciones buscando ingredientes funcionales, esto es, compuestos aislados o mezclas que añadidos a los alimentos podrían proporcionarles unos efectos beneficiosos extras en la salud y que podrían cubrir los déficits existentes en ciertos sectores de la población.

## 1.5 METODOLOGÍA DISPONIBLE PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen una gran capacidad de métodos para determinar la capacidad antioxidante de extractos de alimentos. Se han planteado una serie de condiciones que debería reunir un procedimiento estandarizado de medida de capacidad antioxidante *in vitro* (Frankel & Meyer, 2000; Prior, Wu & Schaich, 2005):

- Evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomo de hidrógeno
- Especificar el sustrato de oxidación
- Medir reacciones químicas que de hecho ocurran en reacciones potenciales, es decir, asegurar que el sustrato y el modo de inducir la oxidación son relevantes como fuentes de daño oxidativo
- Ser sencillo.
- Tener un mecanismo y un punto final definido.
- Poseer una instrumentación más o menos disponible.
- Tener una buena reproducibilidad entre días.
- Ser adaptable para medir antioxidante hidrofílicos y lipofílicos.
- Usar distintas fuentes de radicales.
- Ser adaptable para análisis rutinarios a gran escala.

Sin embargo, la realidad es que no existe ningún método en la actualidad que reúna tales características y es difícil que llegue a ser posible evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método, en vez de por la combinación de varios, como se hace en la actualidad. Esto se debe a varias razones; en primer lugar, los antioxidantes pueden ejercer su acción mediante mecanismos muy diversos (pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, capturar radicales libres, quelar metales, formar complejos, reducir algunos compuestos, inducir la actividad de sistemas biológicos antioxidantes...) y en un mismo alimento puede haber mezclas de diferentes antioxidantes con distintos mecanismos de acción y entre los que, además, se pueden establecer reacciones sinérgicas, por lo que serán necesarios distintos análisis para poder considerar las posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes en un alimento.

Por otro lado, además del mecanismo de reacción, existen otros factores que también deben considerarse al determinar la capacidad antioxidante de muestras tan complejas como son los extractos de alimentos, tales como las propiedades coloidales del

sustrato, el estado de oxidación y la localización del antioxidante en las distintas fases, la composición del sistema, el tipo de sustrato oxidable, el modo de provocar la oxidación, la naturaleza heterogénea y heterofásica del sistema, las interacciones con otros componentes, etc. (Mantle et al., 1998; Yu & Ong, 1999; Frankel & Meyer, 2000)

Por ejemplo, en lo que se refiere a las emulsiones, los antioxidantes lipofílicos son mejores para las emulsiones o/w, porque se sitúan entre el agua y el aceite, protegiendo el aceite, mientras que los hidrofílicos se disuelven en la fase acuosa. A su vez, los antioxidantes hidrofílicos son mejores para medios aceitosos, porque se sitúan entre el medio y el aire, protegiendo al aceite, mientras que los lipofílicos se disuelven en el medio. Esto se conoce como paradoja polar de Porter (Frankel & Meyer, 2000)

Así mismo, se debe tener en cuenta que muchos compuestos que previenen la oxidación lipídica no lo hacen con la de proteínas o ADN, o incluso la potencian, como ocurre con el BHA, que oxida el ADN, aunque no a las concentraciones que se pueden ingerir habitualmente (Aruoma, 2003) Así mismo, la vitamina E impide la oxidación inducida por iones metálicos o por peroxinitrito, pero no la inducida por hipoclorito ni la oxidación lipídica inducida por lipooxigenasa (Niki, 2002)

Por todas estas razones, un gran número de autores han planteado la necesidad de combinar más de un método de medida en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* (Frankel & Meyer, 2000; Sanchez-Moreno, 2002; Aruoma, 2003; Prior, Wu & Schaich, 2005).

En cualquier caso, todos los ensayos *in vitro* sobre capacidad antioxidante de extractos de alimentos, deben completarse con ensayos *in vivo*, así como con estudios sobre el posible efecto prooxidante de estos compuestos a dosis elevadas (Frankel & Meyer, 2000), ya que en estos compuestos existe un delicado equilibrio entre actividad antioxidante y prooxidante.

Finalmente, habrá que considerar si los compuestos responsables de esta capacidad antioxidante son o no biodisponibles en el tracto gastrointestinal y, por tanto, podrán ejercer de hecho ese efecto beneficiosos que potencialmente poseen, así como el grado de retención de ese compuesto en los tejidos. Esta biodisponibilidad vendrá determinada, entre otros factores, por la naturaleza química de estos compuestos, sus efectos dentro de la matriz alimentaria, la combinación de alimentos en la dieta y el estado general de salud (Aruoma, 2003)

Otro aspecto a considerar en la determinación de capacidad antioxidante *in vitro* es que, debido a las múltiples modificaciones hechas en cada uno de los métodos existentes, muchas veces la comparación entre resultados, aun correspondiendo al mismo método de medida, se deben efectuar con precaución, ya que pueden haber existido cambios en la manipulación, en la temperatura del ensayo, en la variedad de la muestra o sus condiciones de procesamiento, en el modo de combinar las muestras con los reactivos (por ejemplo, tiempo de exposición de los compuestos activos a los reactivos, etc.) , en la metodología empleada en la extracción (tamaño de partícula, ciclos de extracción, modo de agitación de la muestra, relación muestra:solvente, etc.) (Bompadre et al., 2004; Mukhopadhyay, Luthria & Robbins, 2006) Así mismo, el hecho de que en el sistema a analizar haya una alta o una baja actividad de agua es también importante, ya que este factor afecta a la migración de compuestos, puede producir fenómenos de cristalización, coalescencia, complejación, colapsos de estructuras, etc. (Mukhopadhyay, Luthria & Robbins, 2006) Además, se debe tener en cuenta el hecho de que, en la literatura, los resultados para un mismo método se expresan de múltiples formas, lo que dificulta su comparación (Villaño et al., 2005)

### 1.5.1 Reacciones SET y reacciones HAT

Aunque, como se ha explicado, existen una gran cantidad de mecanismos por los que los antioxidantes alimentarios pueden ejercer su acción, entre aquellos compuestos que reaccionan directamente con los radicales libres, como pueden ser los polifenoles, deteniendo el proceso en cadena de oxidación lipídica (chain- breaking), esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H (Hydrogen Atom Transfer, HAT) o de transferencia de un electrón (Single Electron Transfer, SET) (Prior, Wu & Schaich, 2005), aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar varios métodos de medida de capacidad antioxidante, por lo que, a continuación, se explicará brevemente en qué consiste cada uno de estos dos mecanismos.

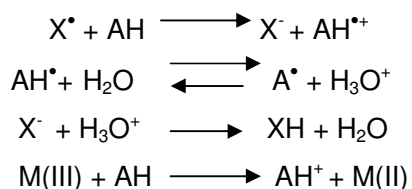
En las reacciones HAT, la reacción sería de este tipo, siendo  $X^{\bullet}$  el radical libre y AH el antioxidante:



El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial.

Por el contrario, en las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, y serían reacciones de

este tipo, siendo de nuevo  $X^\bullet$  el radical libre y AH el antioxidante:



En principio, estas reacciones dependen mucho más del disolvente que las HAT; sin embargo, se ha visto que el disolvente puede ejercer una influencia clara en el ORAC y el ABTS, a pesar de ser métodos HAT (Fernández-Pachón et al., 2004; Villaño et al., 2005)

Estas reacciones son también dependientes del pH. Son métodos muy sensibles al ácido ascórbico y al ácido úrico, que juegan un papel importante en el mantenimiento del status redox del plasma. Algunos elementos traza y contaminantes (sobre todo metales) pueden interferir con estos métodos, resultando en una alta variabilidad y una baja reproducibilidad y consistencia de los resultados.

Las reacciones HAT vienen determinadas por la entalpía de disociación, de manera que un compuesto que la tuviera baja facilitaría la abstracción del átomo de H. Así mismo, se ha observado que ciertos aspectos estructurales, como la presencia de un grupo hidroxilo en posición orto o la posible formación de enlaces intermoleculares entre distintos sustituyentes, pueden contribuir a reducir la entalpía de disociación, facilitando la formación de un radical estable. Por el contrario, las reacciones SET dependen del potencial de ionización (Siquet et al., 2006)

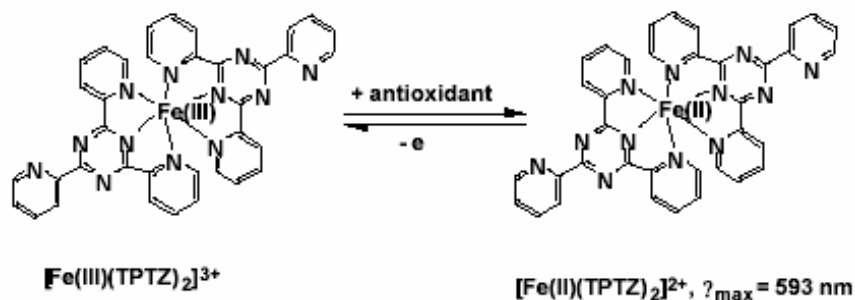
A continuación, se describen brevemente algunos de los principales métodos para la determinación de la capacidad antioxidante, indicando el tipo de reacción que se lleva a cabo en aquellos casos en que se conoce.

### 1.5.2 FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)

Se trata de una reacción SET, que se basa en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante en medio ácido (Benzie & Strain, 1996). Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 595 nm durante 4 minutos, según el método original, aunque este tiempo fue posteriormente ampliado hasta 30 minutos (Pulido, Bravo & Saura-Calixto, 2000), ya que a los 4 minutos muchos compuestos todavía no habían acabado de reaccionar. Los resultados

se expresan en equivalente Trolox ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  o  $\mu\text{mol Trolox/L}$ ), tras elaborar una curva de calibrado de este compuesto, un análogo hidrosoluble de la vitamina E muy utilizado en la expresión de resultados de capacidad antioxidante.

La **Figura 5** muestra la reacción que tiene lugar en este método de medida de capacidad antioxidante



**Figura 5.** Mecanismo de reacción en el método FRAP

Se han planteado diversas críticas a este método:

- Se lleva a cabo a un pH no fisiológico (Prior & Cao, 1999; Pulido et al., 2000)
- Como el potencial de reducción del Fe (III) a Fe (II) es de 0,77 V, cualquier compuesto con un potencial redox inferior podría reducir al Fe (III), sobreestimando el valor de FRAP (Ou, 2002)
- A 593 nm pueden absorber otros compuestos, como la bilirrubina oxidada, que produce biliverdina, aumentando el valor de FRAP (Prior & Cao, 1999; Ou, 2002)
- Hay compuestos como el ácido ascórbico que, además de reducir el ion férrico a ferroso, pueden reaccionar con éste último para generar nuevos radicales libres (Cao & Prior, 1998) Por ejemplo, en fluidos biológicos, el Fe (II) puede interaccionar con agua oxigenada para producir radical hidroxilo (Ou et al., 2001)
- Dado que el FRAP se define como una medida del poder antioxidante total, se trata como iguales a los reductores y a los antioxidantes. Sin embargo, el FRAP no implica a ningún prooxidante ni a ningún sustrato oxidable. Igual que no todos los reductores que transforman el ion ferroso en férrico no son antioxidantes, hay antioxidantes que no son



capaces de llevar a cabo esta reacción, como es el caso del GSH, un importante antioxidante natural que da resultados negativos en el FRAP (Prior & Cao, 1999)

### **1.5.3 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)**

Se trata de una reacción SET, basada en la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico), captura que produce un descenso en la absorbancia a 658 nm. El descenso producido por el Trolox es comparado con el producido por el antioxidante que se está analizando en el mismo tiempo (Miller et al., 1993).

El radical se puede generar enzimáticamente con mioglobina o peroxidasa de rábano; químicamente con Mn O<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> o radical peróxido; electroquímicamente (Villaño et al., 2004). En el método original (Millar et al., 1993) se generaba el radical directamente en presencia del antioxidante, con metamioglobina y peróxido de hidrógeno; éste oxidaba la metamioglobina, que a su vez oxidaba el ABTS. Sin embargo, se vio que algunos polifenoles, como la quercetina, podían interaccionar con los reactivos, impidiendo la formación del radical y dando un valor de capacidad antioxidante sobreestimado, por lo que se pasó a generar el radical previamente a la adición del antioxidante (Re et al., 1999).

No obstante, se han planteado algunas críticas a esta modificación, en el sentido de que los polifenoles, además de reaccionar con el radical para dar lugar a la molécula original, pueden dar lugar a otros compuestos; esto generaría problemas a la hora de determinar la estequiometría de la reacción entre el ABTS y un compuesto o relaciones de estructura-actividad, ya que el cálculo no se podría basar en los moles de molécula no radicalica recuperados (Arts et al., 2004a; Pinelo et al., 2004; Osman et al., 2006) También puede ocurrir que los compuestos polifenólicos formen aductos con el radical, por lo que no toda la pérdida de absorbancia se debería a que el radical volviera a su forma inicial; en este sentido, se ha observado la formación de estructuras de este tipo entre el radical catiónico y la catequina y el floroglucinol (Osman, Wong & Fernyhough, 2006)

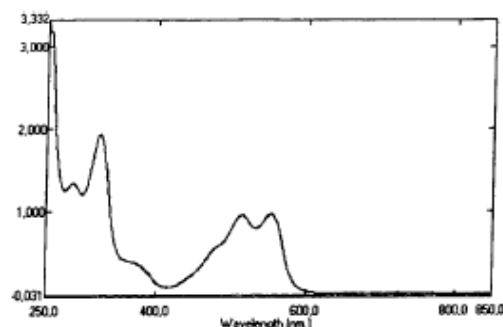
De hecho, la correlación entre los valores de ABTS y el contenido en polifenoles determinado por Folin es superior a los 2 min. de empezar la reacción que a los 15 min., lo que se podría deber a que en la primera parte de la reacción son los polifenoles los que

reaccionan, mientras que en la segunda parte son otros metabolitos derivados (Villaño et al., 2004)

También se ha propuesto medir la absorbancia a 414 nm., donde el radical presenta otro máximo y el límite de detección es inferior, pero tienen lugar más interferencias que a 734 nm. Estas interferencias aumentan la coloración y llevan a una infravaloración de la capacidad antioxidante, porque se mide una reducción en el color inferior a la que realmente se produce (Arnao, 2000; Labrinea & Georgiou, 2004)

#### 1.5.4 Ensayo DMPD (N, N'-dimetil-p-fenilendiamina)

Se trata de un mecanismo SET (Huang, Ou & Prior, 2005), bastante parecido al del método ABTS. En este caso, el radical libre se genera a partir de DMPD (N, N-dimetil-p-fenilendiamina) que, en presencia de una solución oxidante de cloruro férrico, y a pH ácido, se convierte en un radical catiónico coloreado y estable, que presenta un máximo de absorbancia a 505 nm., como se puede ver en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Espectro de absorción UV-visible del DMPD <sup>•+</sup>

Los compuestos antioxidantes son capaces de reaccionar con este compuesto, causando un descenso en la absorbancia. Tras añadir la muestra con antioxidantes a la solución del radical, la absorbancia es monitorizada durante 10 minutos y es comparada con la de un blanco, expresándose finalmente los resultados en equivalentes de Trolox (Fogliano et al., 1999)

### 1.5.5 DPPH (radical 2,2difeníl-1-picrilhidrazil)

En este método se sitúa el DPPH<sup>•</sup>, un radical orgánico, en presencia del antioxidante y se ve en qué grado es capturado, lo que produce un descenso de la absorbancia a 515 nm (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995).

El mecanismo de reacción de este método no está aún totalmente claro. Se pensaba que era un mecanismo simultáneamente SET y HAT; sin embargo, un trabajo ha sugerido que el mecanismo fundamental es SET, y que la reacción de tipo HAT tendría una escasa contribución, dado que se produce lentamente en disolventes que son fuertes aceptadores de H, como el metanol o el etanol (Foti et al., 2004)

Este método fue modificado por Sanchez-Moreno et al. (1998), que introdujo parámetros cinéticos: la EC<sub>50</sub>, que es la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la cantidad inicial de radical; el t<sub>EC50</sub>, que es el tiempo necesario que necesita esa concentración para reducir en un 50% la cantidad inicial de radical y la eficiencia antirradicálica (AE)= 1/( EC<sub>50</sub>\* t<sub>EC50</sub>), que tiene en cuenta los dos factores. Cuanto mayor sea AE, el antioxidante ejercerá su acción con menos concentración y en menos tiempo, lo que interesa en sistemas biológicos. Sin embargo, cuando los antioxidantes se usan como aditivos alimentarios, el objetivo puede ser que mantengan su acción durante un tiempo prolongado, por lo que habría que considerar independientemente los dos factores.

Así mismo, Torres et al. (2002), añadieron dos nuevos parámetros: multiplicando la EC<sub>50</sub> (expresada en mol compuesto/mol DPPH) por dos, se obtiene la estequiometría de la reacción entre patrones y el radical. El inverso de este valor representa los moles de radical reducidos por mol de antioxidante y da una idea de los átomos de H que intervienen en la reacción.

No obstante, se debe señalar que el DPPH<sup>•</sup> es un radical orgánico nitrogenado y estable, que no tiene nada que ver con los radicales peroxilo altamente reactivos implicados en reacciones *in vivo* (Wu, 2004)

Por otro lado, la absorbancia a 515 nm. puede interferir con la de otros compuestos, como los carotenoides, con lo que se subestimaría el DPPH<sup>•</sup> remanente y, por tanto, la capacidad antioxidante de la muestra (Prior,Wu & Schaich, 2005). Así mismo, al ser una longitud de onda cerca de la franja visible, la capacidad antioxidante de la muestra se puede

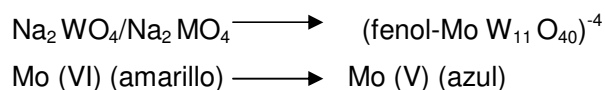
subestimar debido a la interferencia de otros compuestos de la muestra que también absorben (Arnao, 2000)

Finalmente, otro inconveniente de este método es que puede haber un impedimento estérico en las moléculas con mayor peso molecular (Prior, Wu & Schaich, 2005)

### **1.5.6 Ensayo Folin-Ciocalteu**

Se trata de una reacción simultánea HAT y SET. No es exactamente un método de medida de capacidad antioxidante, sino de contenido en polifenoles. Sin embargo, dado el importante papel de los polifenoles en la capacidad antioxidante de los alimentos, en muchos trabajos se ha acabado asimilando como un método de determinación de capacidad antioxidante. Se basa en la reacción de reducción de un heteropolianión que contiene Molibdeno (Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventós 1999).

En el método original, se cuantificaban tirosina y triptófano, y la reacción que se medía a 745-750 nm. era:



Pero en el método modificado el reactivo es un heteropolianión formado por  $3\text{H}_2\text{O-P}_2\text{O}_5\text{-13 WO}_3\text{-5 Mo O}_3\text{-10 H}_2\text{O}$  y  $3\text{H}_2\text{O-P}_2\text{O}_5\text{-14 WO}_3\text{-4 Mo O}_3\text{-10 H}_2\text{O}$

Los metales tienen un estado de oxidación de 6, pero durante la reacción, en medio básico, hay una reducción a un estado de oxidación entre 5 y 6 que se acompaña de un cambio en el color de amarillo a azul. Este cambio será mayor cuanto mayor sea el contenido en compuestos fenólicos. Los resultados se interpolan en una curva de calibrado de ácido gálico y se expresan en equivalentes de ácido gálico.

Se debe señalar que, a pesar de lo extendido que se encuentra, muy pocos artículos siguen exactamente el protocolo original de este método. Además, muchos, en vez de expresar los resultados en equivalentes de ácido gálico, lo hacen en catequina, ácido colorogénico, cafeico, protocatecuico, vanilínico o ferúlico, lo que dificulta la comparación de los resultados. Todo esto hace que, por ejemplo, los resultados de Folin en la bibliografía para los arándanos lleguen a oscilar entre 22 y 4180 mg. equivalentes ácido gálico/100 g. (Prior, Wu & Schaich, 2005)

Por otro lado, el hecho de que la medida se realice a 730 nm., que es una longitud de onda muy elevada, en la que pueden interferir muchos compuestos coloreados, así como que el método se basa en una reacción de reducción muy genérica, hace que una gran cantidad de sustancias puedan interferir en este ensayo: azúcares, ácido ascórbico, ácidos orgánicos, Fe (II), adenina, adenosina, alanina, anilina, ácido aminobenzoico, benzaldehído, creatinina, cisteína, cistidina, citosina, dimetilnilina, defenilamina, AEDT, fructosa, guanina, guanosina, glicina, hidroxilaminas, histamina, indol, metilamina, ácido nitriloacético, ácido oleico, feniltiourea, proteínas, purinas, piridoxina, sacarosa, ácido sulfanílico, tiourea, timina, timidina, trimetilamina, triptófano, uracilo, ácido úrico y xantina, entre las sustancias orgánicas. Entre las sustancias inorgánicas, interfieren: hidrazina, sulfato amónico de hierro, sulfato de hierro, sulfato de manganeso, nitrito de potasio, cianuro de sodio, metabisulfito de sodio, fosfato de sodio, sulfito de sodio, cloruro de zinc (Box, 1983; Ikawa et al., 2003; Prior, Wu & Schaich, 2005)

#### **1.5.7 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)**

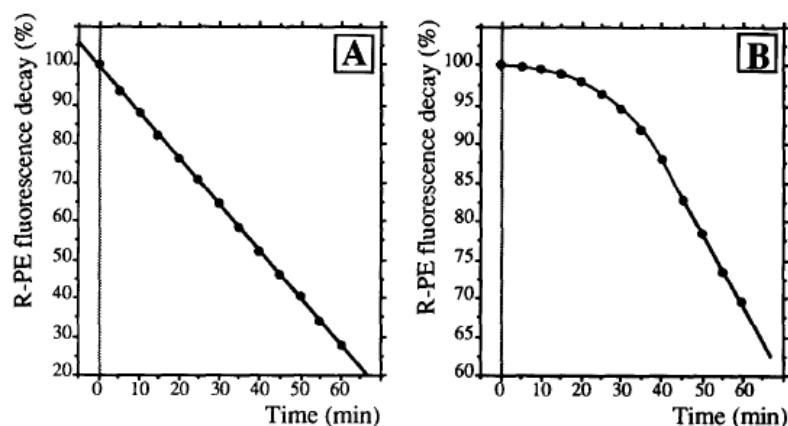
Se trata de un mecanismo HAT. Mide la capacidad de captación de un radical específico, el peroxilo, generado a partir de la molécula orgánica AAPH, que se trata de un iniciador de tipo azo. Estos radicales atacarán a la molécula de fluoresceína, produciendo fluoresceína oxidada, que ya no emite fluorescencia y, produciendo, por tanto, un descenso en la misma (longitud de onda de excitación 493 nm. y de emisión 515 nm.) En presencia de antioxidantes, éstos reaccionan con los radicales peroxilo y la fluoresceína mantendrá la misma emisión de fluorescencia. Por tanto, se lleva a cabo una comparación entre el descenso en la fluorescencia producido en presencia y en ausencia de un antioxidante (Ou et al., 2001). A las concentraciones empleadas, el AAPH tiene una ratio respecto al antioxidante mucho mayor que el ABTS<sup>•+</sup> en el TEAC, con lo que se asegura que los radicales peroxilo interaccionarán con el antioxidante (Cao & Prior, 1998)

Inicialmente, la reacción se llevaba a cabo con beta-ficoeritrina ( $\beta$ -PE), una proteína aislada de *Porphyridium cruentum*, como fuente de radicales peroxilo. Sin embargo, la  $\beta$ -PE no proporciona resultados reproducibles y no es fotoestable, por lo que después de una cierta exposición a la luz se puede fotodegradar. Además, se ha visto que forma ciertos enlaces no específicos con polifenoles, que hacen que se subestime la capacidad antioxidante. Finalmente, la muestra comercial sólo tiene un 30% de pureza. Por esta razón, se buscó una alternativa, que es la fluoresceína- 3,6'-dihydroxy-spiro [isobenzofuran-1 [3H], 9'[9H]-xanthen]-3-ona (Ou et al., 2001)

No obstante, se debe recordar que el ORAC mide la capacidad de captación de un ROS en concreto (presente, en cualquier caso, en una molécula que no se encuentra en el organismo), pero en el cuerpo humano se forman muchos otros que se deberían medir por otros métodos (Ou et al., 2001; Ou et al., 2002). Otro inconvenientes de este método son que la cinética de la reacción puede variar en función de la concentración de antioxidante (López et al., 2003).

### 1.5.8 TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter)

Se trata de una reacción HAT. Al igual que el ORAC, determina la captación de radicales peroxilo, en este caso generados a partir del ABAP. La oxidación es inicialmente inhibida durante un periodo de tiempo –lag phase- por el antioxidante, y lo que se hace es comparar la duración de este periodo (T) para la muestra y para el Trolox. (Ghiselli et al., 1995; Serafini, 2000). La **Figura 7** (Ghiselli et al., 1995) muestra el descenso en la fluorescencia frente al tiempo que se produce en ausencia del antioxidante (izquierda) y la lag-phase que se genera al añadir un antioxidante (derecha), retrasando el inicio de la pérdida de fluorescencia.



**Figura 7.** Evolución de la intensidad respecto al tiempo en el método TRAP

Distintos autores han usado muchos puntos finales diferentes, lo que dificulta la comparación de los resultados. Además, no todos los antioxidantes poseen una lag-phase claramente establecida (Prior, Wu & Schaich, 2005)

### **1.5.9 Oxidación de las LDLs**

Se trata de una reacción HAT. La oxidación de las lipoproteínas LDLs por los radicales libres es un proceso que ocurre en los seres vivos y es una de las primeras etapas en el proceso de la aterosclerosis. En este método se induce la oxidación de LDLs aisladas de distintos individuos mediante diferentes elementos y compuestos, como  $\text{Cu}^{2+}$  o AAPH y después se mide la absorbancia a 234 nm., a la cual absorben los dienos conjugados generados durante el proceso de oxidación de las LDLs (Esterbauer et al., 1989; Kleinvald et al., 1992)

La absorbancia se va modificando con el tiempo en tres fases: una lag-phase, en la que los dienos no se han comenzado a formar por la presencia de antioxidantes en la muestra y, por tanto, no aumenta; una fase de propagación, en la que aumenta de manera exponencial por la formación de dienos; y una fase de descomposición de los mismos, en la que la absorbancia tiende a bajar lentamente.

Se han propuesto una gran cantidad de parámetros que se pueden medir en este ensayo, desde la comparación de la duración de la lag-phase entre un blanco y una muestra con antioxidante (en la que esta fase será más larga), la cantidad inicial de dienos conjugados, la cantidad máxima de los mismos (Kleinvald et al., 1997; Hurtado et al., 1997) u otro parámetro desarrollado por nuestro grupo, el  $\text{CLT}_{50}$ , que mide la cantidad de antioxidante necesaria para aumentar la lag-phase en un 50% respecto al control (Sánchez-Moreno, Jiménez-Escrig & Saura-Calixto, 2000)

### **1.5.10 CBA (Crocín Bleaching Assay)**

Se trata de un mecanismo HAT, basado en la oxidación (decoloración) de la crocina, un derivado natural de carotenoides, por radicales peroxilo generados a partir del AAPH (Bors, Michel & Saran, 1984). Se mide la tasa de decoloración de la crocina en presencia y en ausencia de antioxidantes a 434 nm., donde la crocina presenta un máximo de absorbancia. Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox.

Se han planteado diversas críticas a este método (Huang, Ou & Prior, 2005), como que la relativamente baja longitud de onda a la que se mide coincide con muchos pigmentos alimentarios, como los propios carotenoides. Por otro lado, la crocina es una mezcla de pigmentos naturales extraídos del azafrán y que presenta una gran variabilidad entre distintos lotes, lo que limita su aplicación a gran escala. Además, los mecanismos de

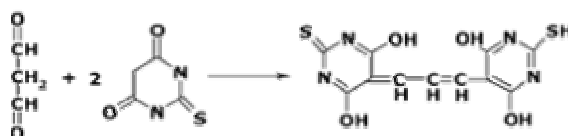
reacción de diferentes antioxidantes con la crocina pueden variar mucho, lo que dificulta la interpretación de los resultados.

No obstante, y dada la variabilidad existente entre los distintos protocolos publicados para este método, un trabajo reciente (Ordoudi & Tsimidou, 2006) analizó paso a paso este método, solventando alguno de los problemas anteriormente indicados, como los productos que se pueden utilizar como fuente de crocina, y proponiendo la aplicación de nuevos parámetros.

#### 1.5.11 TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Species)

Se basa en la medida de la absorbancia a 532-35 nm. de un complejo cromógeno formado entre el ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído (MDA), siendo éste un producto secundario de la oxidación lipídica, formado a partir de ácidos grasos poliinsaturados de al menos 3 enlaces. Cuanto más efectivos sean los antioxidantes presentes en la muestra, menor será la cantidad de MDA generado, y, por tanto, la absorbancia medida (Fernández, Pérez-Álvarez & Fernández-López, 1997)

La **Figura 8** muestra la reacción entre el MDA y TBA, con una estequiometría 1:2.



**Figura 8.** Reacción entre el MDA y el TBA.

Sin embargo, el malondialdehído puede reaccionar con otros compuestos que contribuyen a la absorbancia y, además, hay otros compuestos que absorben a esa longitud de onda.



### **1.5.12 TOSC (Total oxyradical scavenging capacity)**

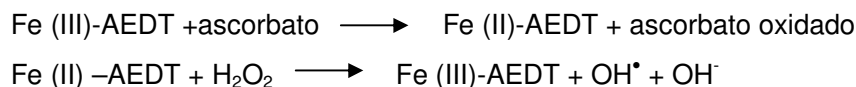
Se basa en la oxidación del ácido alfa-ceto-gamma-metilbutírico a etileno por la acción de radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito generados a partir del 2,2'-azobis-amidinopropano (ABAP). La formación de etileno, que es parcialmente inhibida por la presencia de antioxidantes, es monitorizada por el análisis del espacio de cabeza por GC (Gas Chromatography). El valor TOSC se halla comparando el área de la muestra con la de un patrón (Winston et al., 1998)

Recientemente (MacLean, Murr & De Ell, 2003) propusieron una modificación en este método para expresar los resultados en equivalentes Trolox, solucionando uno de los principales problemas del método original, que, aunque era una técnica muy rápida, no tenía una expresión clara de resultados.

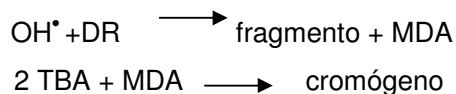
No obstante, la reacción tiene una cinética que no hay una relación dosis-respuesta entre la cantidad de antioxidante y el porcentaje de inhibición, lo que dificulta la comparación entre distintos alimentos (Prior, Wu & Schaich, 2005)

### **1.5.13 Ensayo de la deoxirribosa**

Este método mide la capacidad de un antioxidante o mezcla de antioxidantes para capturar radicales hidroxilo. Se basa en el siguiente sistema de reacciones:



Cuando a este sistema se le añade deoxirribosa (DR), se producen estas reacciones:



En presencia de un antioxidante, éste captará radicales hidroxilo, evitando la formación del cromógeno y reduciendo, por tanto, la absorbancia medida a 533 nm. (Halliwell, Gutteridge & Aruoma, 1987)

Si se elimina el ascorbato del medio, lo que se mide es la capacidad del antioxidante para reducir el Fe (III)-AEDT a Fe (II)-AEDT

#### **1.5.14 Ensayo de la xantina oxidasa**

La xantina oxidasa es una de las principales fuentes in vivo de especies de oxígeno reactivas. Es una deshidrogenasa que transfiere el electrón al NAD, oxidando la xantina o la hipoxantina a ácido úrico, pero que, en condiciones de estrés oxidativo, se transforma en una oxidasa por proteólisis limitada. En este caso, reacciona con el oxígeno en vez de con el NAD, produciendo superóxido y agua oxigenada.

La capacidad de captura de superóxido de muchos antioxidantes se mide a partir de la inhibición de la generación de superóxido a través del sistema hipoxantina-xantina (HXO-XO) (Sánchez-Moreno, 2002), expresando los resultados en % de inhibición de la actividad enzimática, a partir de los cambios producidos en la absorbancia a 295 nm. tras la adición de una muestra, comparados con los producidos en presencia de un blanco.

También se han desarrollado modificaciones a este método en las que la reacción no se monitoriza mediante la medida de cambios en la absorbancia, sino por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Owen et al., 2000) o donde lo que se determina es la evolución en la formación de ácido úrico (Trevisan et al., 2006)

## **1.6 METODOLOGÍA DISPONIBLE PARA LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VIVO***

Muchos de los métodos anteriormente presentados (FRAP, ABTS, ORAC,) pueden ser aplicados para la determinación de capacidad antioxidante en muestras biológicas. Son una elección habitual en la determinación *in vivo* del status antioxidante dada su sencillez, aunque siempre se deben combinar con otras medidas, como biomarcadores de daño oxidativo, ya que los resultados que han proporcionado han sido contradictorios (Wirleitner et al., 2003; Bompadre et al., 2004; Pellegrini et al., 2007):

- Se ha visto un aumento del ABTS en el plasma de pacientes con infección aguda de miocardio y un descenso en bebés prematuros. En los segundos, se debía a un descenso en el contenido en proteínas, pero no a un descenso en el status antioxidante.

- El ácido úrico interfiere en la determinación de la capacidad antioxidante de plasmas, sobre todo en pacientes urémicos, pero también en controles sanos.

- El aumento en la permeabilidad capilar inducido por situaciones de hiperoxia y la redistribución de antioxidantes entre los tejidos lleva a una aumento de la capacidad antioxidante determinada en plasma de ratas, sin que éste haya ocurrido realmente.

- Al determinar FRAP en plasma de pacientes hemodializados, los enfermos mostraron mayor capacidad antioxidante que los sanos. Además, se encontró una correlación positiva entre el FRAP y la uricemia, así como entre el FRAP y la concentración de bilirrubina. Se encontró una correlación positiva entre el FRAP y el MDA, pero también entre el FRAP y los triglicéridos, prooxidantes.

- La capacidad antioxidante de plasmas determinada por ABTS aumenta un 15% con cada aumento de 5°C en la temperatura, y dado que los datos publicados se obtienen a distintas T, esto explicaría parte de la variabilidad obtenida entre los resultados

- Al aplicar el ABTS a alimentos y plasmas de la manera tradicional y con un sistema FIA, los resultados no variaban entre alimentos, pero sí lo hacían mucho en el plasma

- Tras aplicar un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos ricos en antioxidantes a 300 individuos, no se encontró una relación entre las ingestas referidas y la capacidad antioxidante plasmática.

Por otro lado, los polifenoles en plasma aparecen mayoritariamente como glucurónidos o sulfatos, es decir, con una estructura diferente a la que presentan en los alimentos vegetales y que son las que se suelen estudiar.

Así mismo, al aplicar el ORAC y, en ocasiones, el ABTS al plasma, éste se desproteíniza previamente, dado que las proteínas plasmáticas pueden aparecer como interferencias en estos ensayos, proporcionando un valor de capacidad antioxidante sobreestimado. Sin embargo, se ha observado que, al precipitar estas proteínas, pueden arrastrar con ellas compuestos antioxidantes, por lo que la capacidad antioxidante determinada en plasmas desproteinizados sería inferior a la real (Arts et al., 2001) Estos mismos autores confirmaron que esto se debe a la precipitación con proteína, y no a que el ácido empleado en la precipitación reaccione con los polifenoles. Todos estos resultados llevaron a estos autores a sugerir que el ABTS no es un método correcto para determinar efectos *in vivo* de preparaciones conteniendo flavonoides. Estas conclusiones podrían aplicarse igualmente al uso del ORAC en plasmas en el que, al desproteínizar el plasma, el valor original se reduce en torno a 20 veces (Ou et al., 2001) y es de esperar que esta reducción se deba también a un cierto arrastre de compuestos fenólicos.

Aunque en general los métodos antes señalados se han aplicado a plasmas, el ABTS también se ha aplicado en orina (Kirschbaum, 2001). Sin embargo, como el propio autor de este trabajo señala, la orina es un fluido de composición más difícilmente predecible que el plasma, reflejando los cambios que se producen de manera permanente en el organismo, por lo que sería un fluido aún menos apropiado para la determinación *in vivo* de capacidad antioxidante. También se ha desarrollado recientemente una modificación del método Folin para su aplicación en la orina (Roura et al., 2006) en la que se lleva a cabo una separación previa de polifenoles por SPE, eliminando otros compuestos que suelen interferir este ensayo y que, por tanto, podría ser algo más selectivo.

Por otro lado, dado que muchos de estos análisis no se llevan a cabo en condiciones fisiológicas o emplean reactivos no fisiológicos, es difícil determinar hasta qué punto se podrían trasladar estos resultados a los seres vivos (Pulido et al., 2000; Serafini, 2000; Pulido, 2003). Así mismo, al comparar valores se debe tener en cuenta que medidas efectuadas *in vivo* en animales pueden no corresponder a resultados que tendrían lugar en

humanos, ya que, por ejemplo, tanto la coenzima Q como la vitamina E, dos importantes antioxidantes hidrofóbicos, tienen concentraciones cuatro y tres veces más altas, respectivamente, en plasma de ratas que en plasma humano (Bompadre et al., 2004)

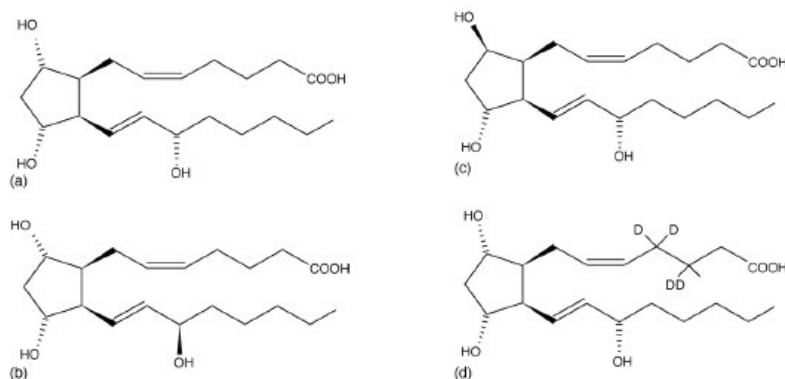
Por todo esto, para análisis *in vivo* sería más recomendable recurrir directamente a la medida de biomarcadores presentes en las muestras biológicas como consecuencia del daño oxidativo. A continuación se presentan los biomarcadores utilizados más frecuentemente en la determinación *in vivo* de daño oxidativo a biomoléculas.

## 1.7 BIOMARCADORES PARA LA DETERMINACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO

### 1.7.1 Biomarcadores de oxidación lipídica

#### 1.7.1.1 Isoprostanos

Los F2-isoprostanos se forman a partir del ácido araquidónico en las membranas de los fosfolípidos, mediante una reacción catalizada por radicales libres. Su ruptura por fosfolipasas genera F2-isoprostanos libres, que circulan en forma esterificada y no esterificada, y se excretan en la orina. Pueden dividirse en 4 subgrupos de regioisómeros: III, IV, V y VI, con 16 isómeros posibles en cada subgrupo (Claeson Bohnstedt et al., 2003). De todos ellos, sólo existen cuatro estándares disponibles comercialmente, que se muestran en la **Figura 9**.



**Figura 9.** Estándares de isoprostanos disponibles comercialmente.

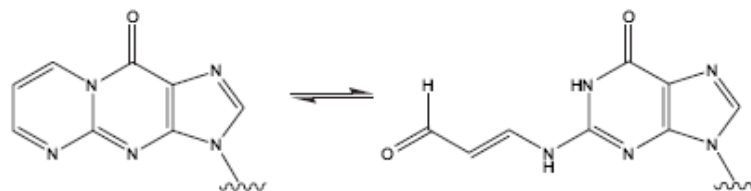
Existen métodos de medida basados en inmunoafinidad, pero la información que proporcionan es semicuantitativa, ya que durante la manipulación se generan nuevos isoprostanos. Lo más habitual es determinarlos mediante HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) o GC-MS (Gas Chromatography- Mass Spectrometry) (Claeson Bohnstedt et al., 2003; Zadch-Nourooz et al., 2005)

Se ha observado que, al medir isoprostanos en sujetos en ayunas, los niveles aumentan según aumentan las horas en ayuno, puede que por un aumento del estrés oxidativo o porque se favorezca la liberación de isoprostanos del tejido adiposo por lipólisis. Por esto, no está claro si se deberían medir los isoprostanos estando en ayunas o no, ya que la dieta inmediata no afecta a su excrección (Lee, Jenner & Halliwell, 2004)

Se han descrito niveles aumentados de isoprostanos en sujetos con aterosclerosis, Alzheimer, hipercolesterolemia, hipertensión, preeclampsia, fibrosis quística, diabetes tipo II e índice de masa corporal elevado, respecto a sujetos sanos (Dietrich et al., 2002), planteándose su posible uso como un marcador independiente de riesgo cardiovascular (Young, 2005), aunque, en cualquier caso, aún no existen niveles de referencia (Lee, Jenner & Halliwell, 2004)

#### 1.7.1.2 MDA (Malondialdehído)

La ruptura de los hidroperóxidos lipídicos generados a partir de ácidos grasos poliinsaturados genera distintos aldehídos, entre los que se encuentra el malondialdehído o MDA, compuesto citotóxico y del que niveles elevados se han relacionado con un gran número de enfermedades (Mateos & Bravo, 2007) Así mismo, el MDA puede interaccionar con el ADN, formando el aducto que se muestra en la **Figura 10** y dando lugar a mutagenicidad (Del Rio, Stewart & Pellegrini, 2005)



**Figura 10.** Formación del aducto MDA-ADN

El MDA en fluidos biológicos se suele determinar mediante HPLC-UV-vis o HPLC-fluorescencia y, como no se puede detectar como tal, es necesaria una reacción previa de derivatización. Aunque existen distintos compuestos con los que llevar esto a cabo, las reacciones más habituales son:

- Derivatización con dinitrofenilhidrazina (DNPH). Se forma una hidrazona que es característica de cada aldehído y las condiciones de derivatización son suaves, lo que produce una separación altamente selectiva. Sin embargo, en ocasiones es difícil de determinar a bajas concentraciones (Pilz, Meineke & Gleiter, 2000); en particular, aunque puede resultar un biomarcador adecuado para determinar daño oxidativo en plasma de ratas, resulta más difícil de determinar a los niveles en que se encuentra en plasma de humanos (Pulido, 2003)

- Derivatización con ácido tiobarbitúrico (TBA). Se genera el mismo cromógeno que en el método TBARs para la determinación *in vitro* de capacidad antioxidante, aunque al detectarse en este caso por HPLC resulta un método más selectivo (Lauridsen & Mortesen, 1999; Young et al., 1999) No obstante, el tratamiento a casi 100°C en medio ácido durante un tiempo prolongado que es necesario para generar el aducto MDA-TBA puede dar lugar a artefactos, incluso aunque se añada previamente un antioxidante sintético, como el BHT (Mateos & Bravo, 2007).

Una pequeña parte del MDA se encuentra libre y la mayoría está asociado a proteína, por lo que para determinarlo es necesario hidrolizar previamente el MDA unido a proteína. Las variaciones en las condiciones empleadas en la hidrólisis y en la posterior derivatización, que en general implican elevadas temperaturas durante tiempos prolongados pueden explicar las diferencias obtenidas entre distintos autores al determinar MDA.

Sólo la forma libre es químicamente activa y supone un daño potencial. El MDA ligado excretado en la orina indica un daño antiguo. Sin embargo, los métodos antes indicados sólo determinan el MDA total. Por eso, se han desarrollado metodologías de GC-MS con dilución de isótopo que permiten las medidas directas del MDA libre y total y la indirecta del ligado, facilitando una mayor comprensión del status antioxidante (Cighetti et al., 1999). No obstante, estos métodos suelen ser más laboriosos que los existentes de HPLC

También se han desarrollado métodos inmunoenzimáticos para determinar el MDA unido a LDLs (Woodside et al., 1999), así como métodos que combinan HPLC con electroforesis capilar de alta eficacia (ECAE) para detectar directamente el MDA, sin necesidad de derivatización (Mateos & Bravo, 2007)

El mayor inconveniente de la elección de MDA como biomarcador de daño oxidativo es que se produce también en los alimentos y puede ser absorbido en el tracto gastrointestinal, interfiriendo, por tanto, en la determinación de los niveles de MDA *in vivo* (Wilson et al., 2002)



### 1.7.1.3 Alcanos exhalados

Se mide la exhalación de hidrocarburos volátiles, principalmente etano y pentano, compuestos derivados de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. En concreto, el etano se genera a partir de ácidos grasos  $\omega$ -3, como el linoleico, y el pentano a partir de ácidos grasos  $\omega$ -6, como el linoleico y el araquidónico.

Se ha observado una relación entre el aumento en la exhalación de estos compuestos y ciertas enfermedades y procesos, como infarto de miocardio, isquemia hepática, isquemia abdominal, isquemia cardíaca, síndrome de colon irritable, VIH, rechazo agudo de trasplante de corazón, o tras un bypass cardiopulmonar (Aghdassi & Allard, 2000; Miekisch, Schubert & Noeldge-Schomburg, 2004)

La detección de estos alcanos se lleva a cabo por GC. La principal ventaja de este método es que se trata de un procedimiento no invasivo. Sin embargo, existen problemas de contaminación de muestra con el aire del ambiente, por lo que es necesario realizar una limpieza previa del pulmón con aire libre de hidrocarburos; problemas de almacenamiento; los valores obtenidos pueden estar infravalorados o sobreestimados en función de donde se hayan producido los alcanos (pulmón, tracto gastrointestinal, colon, etc.), lo que hará que su exhalación sea más o menos rápida etc. (Kneepken, Lepage & Roy, 1994; Drury, Nycyk & Cooke, 1997; Aghdassi & Allard, 2000)

### 1.7.1.4 Oxidación *ex vitro* de LDLs

Se ha descrito previamente el método de oxidación *in vitro* de LDLs, en el que LDLs aisladas de varios individuos se someten a oxidación en presencia de una muestra rica en antioxidantes. Otra variante de este método es someter al mismo proceso de oxidación las LDLs aisladas de un sujeto particular, con el fin de observar su nivel basal de antioxidantes o los efectos de una suplementación con antioxidantes.

Así mismo, otra forma de cuantificar el grado de oxidación de LDLs *in vivo* es a través de la actividad de la paraoxonasa, una organofosfatasa hidrolasa dependiente de Ca y asociada a las HDLs que inhibe la oxidación de LDLs mediada por Cu. Se ha observado que la actividad de esta enzima se reduce en situaciones de estrés oxidativo (Hayek et al., 1997)

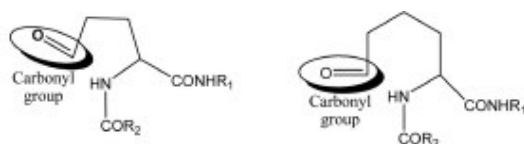
## 1.7.2 Biomarcadores de oxidación proteica

La oxidación proteica da lugar a derivados carbonilos, que pueden formarse mediante ataque oxidativo directo a los grupos laterales de los aminoácidos (prolina, arginina, lisina, treonina), o indirectamente, mediante reacciones secundarias con sustituyentes carbonilo reactivos presentes en carbohidratos (productos de glicooxidación), con lípidos, o con productos finales de glicación /lipooxidación avanzada, dando lugar en este caso a derivados carbonilo de la lisina, la cisteína y la histidina (Mateos & Bravo, 2007)

Niveles elevados de estos compuestos se han visto incrementados en ciertas enfermedades, como cataratas, enfermedad de Alzheimer o esclerosis lateral amiotrófica (Akagawa et al., 2005)

### 1.7.2.1 2-AAS (Aminoadipic semialdehyde) y 2-GGS (Glutamic semialdehyde)

El 2-AAS es el producto de oxidación de la lisina y el 2-GGS el de la prolina y suponen los productos mayoritarios de oxidación proteica (Akagawa et al., 2005) Sus estructuras químicas, con el grupo carbonilo formado durante la reacción de oxidación, aparecen en la **Figura 11**.



**Figura 11.** Estructuras del 2-GGS (izquierda) y del 2-AAS (derecha)

Se han desarrollado distintos métodos para su determinación, como la reducción a ácidos hidroxiaminocaproico e hidroxiaminovalérico, respectivamente, con posterior derivatización con TFAME y detección por GC-MS (Requena et al., 2001); la derivatización con  $\text{FINH}_2$  y posterior detección con HPLC-DAD (Daneshvar et al., 1997); la derivatización con ABA y posterior detección con HPLC-fluorescencia (Akagawa et al., 2005)

### 1.7.2.2 Nitrotirosina

Este derivado oxidado de las proteínas se puede generar por acción del peroxinitrito o de la peroxidasa (Duncan, 2003). Su estructura aparece en la **Figura 12**



**Figura 12.** Estructura de la 3-L-nitrotirosina libre (izquierda) y formando parte de proteínas (derecha)

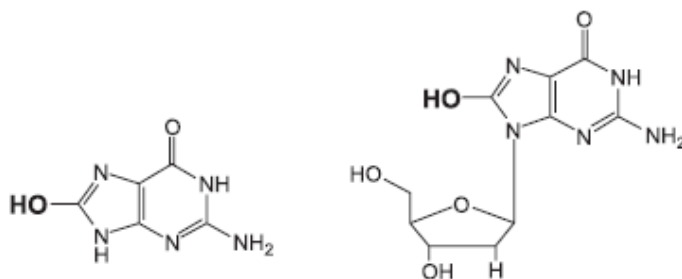
En su análisis, se debe tener en cuenta que una parte está libre, mientras que otra está asociada a proteínas. Sin embargo, si las condiciones de la hidrólisis que se lleva a cabo para liberar la nitrotirosina asociada a proteínas y determinar la total, son muy fuertes, se puede producir una cantidad extra de nitrotirosina en la muestra (Duncan, 2003). Se han desarrollado métodos de análisis por HPLC, HPLC-MS y GC-MS, aunque una reciente revisión (Tsikas & Caidahl, 2005) concluyó que las medidas más robustas se obtienen por GC-MS y muchos de los valores publicados empleando otras técnicas podrían estar sobreestimando los valores reales.

Se debe señalar que los problemas metodológicos asociados a la determinación de este compuestos hacen que la información de la que se dispone sobre las consecuencias fisiológicas y patológicas de la nitración de la tirosina en seres humanos sea todavía limitada (Tsikas & Caidahl, 2005)

### 1.7.3 Biomarcadores de daño a ADN

#### 1.7.3.1 8-OHdG(8-hidroxideoxiiguanosina)

Las especies reactivas de oxígeno pueden atacar al ADN y/o al ARN (ácido ribonucleico), oxidando la guanina. Cuando esto ocurre, si la lesión es reparada, el producto final puede ser la base 8-hidroxiguanina (8-OH Gua) o el nucleótido 8-hidroxideoxiiguanosina (8-OHdG), excretándose ambos a través de la orina. Si la lesión no es reparada, se produce una mutación (Wu et al., 2004; Peoples & Karnes, 2005) Las estructuras de estos productos de oxidación se muestran en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Estructuras del 8-OH Gua (izquierda) y del 8-OHdG (derecha)

Se han encontrado niveles más elevados de 8-hidroxideoxiguanosina respecto a sujetos sanos en células de pacientes con carcinoma (mama, pulmón, hígado, riñón, cerebro, estómago, ovario), así como en en muestras de orina de sujetos con cáncer ginecológico y en pacientes con glaucoma (Hakim et al., 2004). Así mismo, se ha observado una correlación significativa entre los niveles de este compuesto y la edad, aunque no entre su concentración y el Índice de Masa Corporal (Yao et al., 2004)

Existen ciertos métodos de GC-MS, así como ensayos inmunoquímicos, que permiten la medida de 8-OHG, aunque no cuando se encuentra a bajas concentraciones. Por esta razón, en los últimos años se ha tendido más a la medida de 8-OHdG mediante HPLC con detector electroquímico (Tagesson et al., 1995) En cualquier caso, la determinación de 8-OHdG por HPLC resulta bastante laboriosa, siendo necesarios una purificación previa por SPE y el uso de al menos dos columnas en serie, cada una con su propio gradiente de fases móviles (Tagesson et al., 1995; Drury, Jeffers & Cooke, 1998)

Por otro lado, si este compuesto se intenta medir en tejidos, se produce una oxidación extra al aislar el ADN, pero esto no ocurre si se mide directamente en orina (Rebelo, Piedade, Oliveira-Brett, 2004), por lo que las medidas se realizan habitualmente en este fluido biológico.

Finalmente, se ha observado que el 8-OHdG de la dieta no contribuye al excretado en la orina, dado que no es absorbido en el tracto gastrointestinal (Lengger, Schöch & Topp, 2000)

### **1.7.3.2 Comet assay**

Este método se basa en efectuar una medida global de las rupturas que se han producido en la cadena de ADN. Para ello, se emplea una técnica denominada electroforesis en gel de una sola célula, que se puede llevar a cabo en cultivos celulares o en linfocitos aislados de la sangre. Las células se introducen en agarosa, se lisan con detergente y se les aplica una electroforesis alcalina. Durante la misma, el DNA migra desde el núcleo celular hasta el ánodo, generando una “cometa”, en la que la cabeza estaría constituida por el ADN que ha permanecido intacto en el núcleo y la cola por los fragmentos rotos de ADN. La intensidad relativa de fluorescencia en la cola depende de la frecuencia de ruptura en el ADN. Un inconveniente de este método es que muchas genotoxinas no producen ruptura de ADN o, si las producen, como las radiaciones ionizantes, se reparan en seguida (Collins et al., 1997)

Posteriormente, se han introducido modificaciones en este método para determinar bases de ADN oxidadas, como la adición de la enzima endonucleasa III, que provoca rupturas en los puntos en los que existen pirimidinas oxidadas (Aukrust et al., 2005)

Es necesario indicar que este método resulta bastante laborioso en su puesta a punto, con un alto grado de manipulación de la muestra y es necesario tener una gran experiencia para obtener resultados repetitivos. Por eso, si el objetivo buscado en un experimento es medir el estrés oxidativo en general, resulta más recomendable recurrir a otras técnicas (Collins et al., 2004)

En un trabajo de Gedik y colaboradores (2002) se compararon los métodos Comet y medida de 8-OHdG en cultivos celulares y obtuvieron resultados similares, así como al determinar 8-OHdG urinario en la primera orina del día y en la de 24 hs.

### **1.7.4 Biomarcadores de inflamación**

Como ya se ha explicado, existe una estrecha relación entre el proceso de oxidación de biomoléculas y la estimulación de la respuesta inflamatoria. Una vez que los monocitos han ingerido las LDLs oxidadas, que se transforman en células espumosas, éstas activan el proceso de la inflamación, liberando, entre otros compuestos interferón  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), que estimula a los monocitos para liberar ROS y derivados de la neopterina, capaces de aumentar la capacidad oxidante de los ROS, al igual que la homocisteína liberada de las

células T estimuladas. Todos estos compuestos continúan con la oxidación de las LDL. Además, las citokinas liberadas de los monocitos, como el factor de necrosis tumoral  $\gamma$  (TNF  $\gamma$ ) son capaces de amplificar la actividad del INF.

Debido a esta interrelación entre oxidación e inflamación, es común el uso de biomarcadores de inflamación como marcadores indirectos del proceso de oxidación *in vivo*.

#### **1.7.4.1 Proteína C reactiva**

La proteína C reactiva o CRP es un marcador inflamatorio sintetizado inicialmente por hepatocitos en respuesta a la interleukina 6, el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral y otras citokinas. Se encuentra en placas arterioscleróticas unidas a LDLs (Nordin- Fredriksson et al, 2004) También se ha determinado una cierta síntesis de CRP en neuronas de pacientes con Alzheimer y en placas ateroscleróticas (Ablij & Meinders, 2002)

La CRP está constituida por 5 subunidades iguales unidas mediante enlaces no covalentes. Cada subunidad está formada por 206 aminoácidos, con un peso total de 23.000 Da (Ablij & Meinders, 2002)

En condiciones fisiológicas, la CRP tiene una concentración media en plasma de 0.8 mg/L. La CRP plasmático sólo depende del grado de síntesis, lo que justifica el uso de la CRP como biomarcador (Ablij & Meinders, 2002) Valores de CRP superiores a 15 mg/L suelen indicar una infección activa o una inflamación no vascular. Por tanto, las medidas se deben repetir unas semanas después cuando la enfermedad haya acabado (Yu & Rifai, 2000)

Estudios epidemiológicos han demostrado que niveles elevados de CRP están relacionados con un mayor riesgo de daño cardiovascular, con el IMC, la hipertensión, el tabaco, los triglicéridos, bajos niveles de HDL, la obesidad, la diabetes de tipo II y el síndrome metabólico (Nordin-Fredriksson, 2004) Así mismo, el aumento de CRP se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular en sujetos asintomáticos pero de alto riesgo (Yu & Rifai, 2000)

Además de actuar como marcador, se ha visto que la CRP también puede tener un papel activo en el desarrollo de la aterogénesis. Así, la proteólisis de la CRP da lugar a péptidos con actividad inmuno-modulatoria, con funciones tanto pro- como anti-inflamatorias (Yu & Rifai, 2000)

Se ha recomendado la medición de CRP como marcador de aterosclerosis, ya que los recuentos de células blancas, los niveles de complemento y el fibrinógeno pueden estar asociados con cualquier proceso inflamatorio, desde síndromes coronarios hasta artritis o infección. Además, aunque el recuento de células blancas puede ser significativamente elevado en personas con aterosclerosis avanzada, no se verían diferencias en personas en una fase previa. En concreto, la Asociación Americana del Corazón y el Centro para Prevención y Control de Enfermedades en EEUU recomendaron en una declaración conjunta en el año 2003 la medida de CRP como el mejor y más útil marcador de inflamación disponible (King, 2005)

Tradicionalmente, la CRP se ha medido por ensayos inmunturbidimétricos e inmunonefelométricos, con un rango de 3-200 mg/L. Los métodos más modernos emplean anticuerpos unidos a una enzima (ELISA) o a un compuesto fluorescente, y mide hasta 0,15 mg/L. Muchos de estos ensayos no pueden simultanear la medida de altas y bajas concentraciones, por lo que en cada caso hay que coger el que más convenga (Yu & Rifai, 2000)

#### **1.7.4.2 Homocisteína**

La homocisteína es un aminoácido sulfurado altamente reactivo. Es un intermediario del metabolismo de la metionina, que se convierte en S-adenosilmetionina, la cual se hidroliza a homocisteína. A su vez, puede ser remetilada a metionina (por el 5-metiltetrahidrofolato en una reacción dependiente de la vitamina B12) o metabolizada a cisteína (con cistationina como intermediario). Las enzimas de estas dos conversiones, la cistationina  $\beta$ -sintasa y la  $\gamma$ -cistationasa, son dependientes de la vitamina B6.

La metionina es la única fuente de homocisteína en el organismo (Nekrassova, 2003). Esto convierte a la homocisteína en un marcador válido de inflamación, puesto que toda la que se encuentre en el organismo será de síntesis endógena.

La homocisteína ha sido descrita como un factor de riesgo independiente para el daño aterosclerótico y aterotrombótico; el 20-30% de los pacientes con enfermedad aterosclerótica tienen hiperhomocisteinemia. Un incremento de 1 micromolar de la homocisteína plasmática se ha visto asociado con un aumento en el riesgo cardiovascular del 10-20% (Ducros et al., 2002; Frick, 2003). Diversos estudios han descrito una relación dosis-respuesta entre la hiperhomocisteinemia y el riesgo de enfermedades cardiovasculares

(Ducros et al., 2002; Nekrassova, 2003). Así mismo, se ha propuesto el uso de la homocisteína como marcador de tumores (Frick, 2003)

Por otro lado, la propia homocisteína también induce la aterosclerosis a través de la proliferación del músculo liso, la activación de las plaquetas, la trombogénesis, la disfunción endotelial y la síntesis de colágeno (Shai et al, 2004; Vanizor Kural, 2003)

Respecto a las formas que presenta la homocisteína en los fluidos biológicos, éstas vienen determinadas por la presencia en esta molécula de un grupo tiol (SH). Así, puede aparecer como el disulfuro homocisteína (RSSR), como un disulfuro mezclado con otros tioles de bajo PM (los disulfuros mixtos homocisteína-cisteína y homocisteína-glutation reducido, RSSR') y unida a proteínas (RSS-proteína) En individuos sanos, la forma libre y reducida de homocisteína es menos del 1-2% del total, los disulfuros mixtos y de bajo PM son el 10-30% y el resto está unido a proteínas (Langman & Cole, 1999; Nekrassova, 2003)

La determinación de la homocisteína libre requeriría un bloqueo inmediato de los grupos tiol libres, un procedimiento que no es conveniente para ensayos clínicos. Por tanto, la determinación de la homocisteína libre se ha abandonado y lo más habitual es determinar la homocisteína total (tHcy) (Ducros et al., 2002) Aunque se ha encontrado una buena correlación entre la homocisteína total y la libre, no está totalmente claro si la medida de la total puede sustituir a la de la libre en todos los casos (Langman & Cole, 1999)

Todos los sistemas cromatográficos, generalmente de HPLC, para la cuantificación de homocisteína requieren la reducción del enlace disulfuro entre la homocisteína y otros tioles o proteínas, seguido de la precipitación de las proteínas; las diferencias se refieren al sistema de detección, así como a los reactivos empleados en la derivatización (Ducros et al., 2002)

La derivatización más usual se lleva a cabo con SBD-F (ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4sulfonate). Este compuesto no exhibe fluorescencia, ni tampoco los productos formados durante su derivatización, lo que supone una ventaja frente a otros agentes derivatizantes como la monobromina, que produce una fluorescencia de fondo, como también lo hacen algunos productos formados durante la derivatización, lo que hace necesario un complicado proceso de elución para separar los compuestos de interés de las interferencias (Minniti et al, 1998; Ducros et al., 2002) Esta ventaja del SBD-F permite hacer la separación en modo isocrático. Sin embargo, el SBD-F requiere condiciones de derivatización más drásticas que la monobromina (Ducros et al., 2002)



En la medida de este biomarcador, es muy importante el tratamiento que se haga a la sangre: debido a la producción permanente de homocisteína en los eritrocitos que se libera al plasma extracelular, los niveles de tHcy en plasma pueden aumentar si la sangre se conserva a temperatura ambiente hasta un 10% 1 hora después de recogerla, un 20-35% a las 4 hs y un 60-75% a las 24 hs (Ducros et al., 2002).

#### **1.7.4.3 Neopterina**

La neopterina es un derivado del GTP que se produce en los monocitos/macrófagos (Murr et al., 2002). El sentido biológico de su síntesis aún no se conoce (Widner et al., 1998). La cantidad de neopterina segregada se correlaciona con la producción de ROS por la célula; por ejemplo, se ha determinado *in vivo* una correlación entre los niveles de neopterina y la oxidación de proteínas (Murrel et al., 2002).

La propia neopterina actúa como prooxidante o favorece la acción de otros oxidantes. Por ejemplo, se ha determinado *in vitro* que la potencia la acción del peróxido de hidrógeno, especialmente en medio neutro o ligeramente básico, y en presencia de Fe, así como la nitración de la tirosina por el peroxinitrito (Murr et al., 1996; Murr et al., 2002). A su vez, en presencia de peroxinitrito y/o de Cu, la neopterina estimula la oxidación de las LDLs (Herfieri et al., 2002).

La neopterina es soluble, a diferencia de las citocinas. Al no estar unida a ningún receptor, es un marcador de inflamación más fácilmente medible (Zuetskova, 2001). Además, las citocinas tienen una vida media en la circulación corta, y rápidamente se unen a células diana o son neutralizadas por receptores solubles específicos (Winkler, 2005). Por otro lado, la determinación de la concentración de neopterina es superior a la cuantificación directa de una citokina, porque estos marcadores permiten detectar el efecto conjunto de varias citocinas pro y antiinflamatorias junto con el del interferón gamma en células diana (Winkler, 2005).

La detección de neopterina se lleva a cabo por HPLC con detector de fluorescencia, mediante un método sencillo y rápido (Fuchs et al., 1992).

#### **1.7.4.4 Ratio kinurenina/triptófano**

La indoleamina-(2,3)-dioxigenasa (IDO), inducible por el interferón gamma, cataliza la primera etapa de la degradación del triptófano, formando el intermediario kinurenina, por lo que la medida de la ratio kinurenina/triptófano se ha planteado como otro posible marcador de inflamación.

Se han visto niveles aumentados de esta ratio en pacientes con artritis reumatoide (Schröecksnadel et al., 2006), con cáncer ginecológico (Schröecksnadel et al., 2005), con enfermedades inflamatorias intestinales (Wolf et al., 2004), con melanoma maligno y peor diagnóstico (Weinlich et al., 2006), así como con el aumento de la edad (Frick et al., 2004)

La medida de este biomarcador, cuya detección se efectúa por HPLC-fluorescencia (Widner et al., 1997) presenta las mismas ventajas que la de la neopterina, al permitir detectar el efecto conjunto de varias citokinas pro y antiinflamatorias junto con el del interferón gamma en células diana (Winkler, 2005)



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **2.1 MUESTRAS**

### **2.1.1 Alimentos e ingredientes**

Las siguientes muestras se emplearon en los distintos ensayos de determinación de capacidad antioxidante *in vitro*:

- Harina de trigo -Gallo S.A., Barcelona, España.
- Arroz -SOS S.A.- Villarejo de Salvanes, Madrid, España.
- Salvado de trigo -Santiveri S.A., Barcelona, España.
- Salvado de avena -Santiveri S.A., Barcelona, España.
- Pan obtenido en una panadería local.
- Orujos de uva tinta y blanca proporcionados por Vinícola de Castilla S.A., Manzanares, Ciudad Real, España.
- Nuez ibérica Pizarro, Borges S.A., Barcelona, España.
- Alga *Fucus vesiculosus* recogida en Ribadeo, Galicia, España.
- Fibra Antioxidante de Uva, un ingrediente funcional previamente patentado por nuestro grupo, elaborado a partir de uva tinta (Saura Calixto & Goñi Cambrodón; Saura Calixto & Larrauri García).

Todas estas muestras se molieron en un molino Retsch ZM hasta un tamaño de particular de 0,5 mm. Cuando presentaban un contenido en humedad apreciable, se liofilizaron previamente.

El arroz fue sometido a cocción (85 g en 200 mL agua), tras lo cual se liofilizó y molió.

Para evitar un posible efecto interferente del elevado contenido en aceite de la nuez en la determinación de capacidad antioxidante, ésta se sometió a un desgrasado a temperatura ambiente: 0,5 g de nuez molida se colocaron en un tubo de ensayo y se añadieron 20 mL de éter de petróleo. El tubo se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 20 minutos, después de los cuales se centrifugó 10 minutos a 2500 *g*, separándose así el aceite de la materia desgrasada.

### **2.1.2 Muestras biológicas**

En los ensayos *in vivo*, se analizaron distintos parámetros en las siguientes muestras biológicas:

- Orina. Se proporcionaron a los participantes en los ensayos recipientes estériles para la recolección de orina. Tras llevar a cabo la determinación de la posible presencia de acetona en orina, se recogieron alícuotas para el resto de determinaciones que se mantuvieron congeladas hasta su uso.

- Sangre. La sangre fue recogida en tubos con K<sub>3</sub> AEDT como anticoagulante y centrifugada a 1500 *g* durante 10 min. A 4 °C. El plasma recogido se mantuvo a -80°C hasta su utilización. Para las medidas realizadas en suero, la sangre se recogió en tubos sin anticoagulante y el suero se separó posteriormente por centrifugación.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Ensayos *in vitro*

#### 2.2.1.1 Extracción de antioxidantes

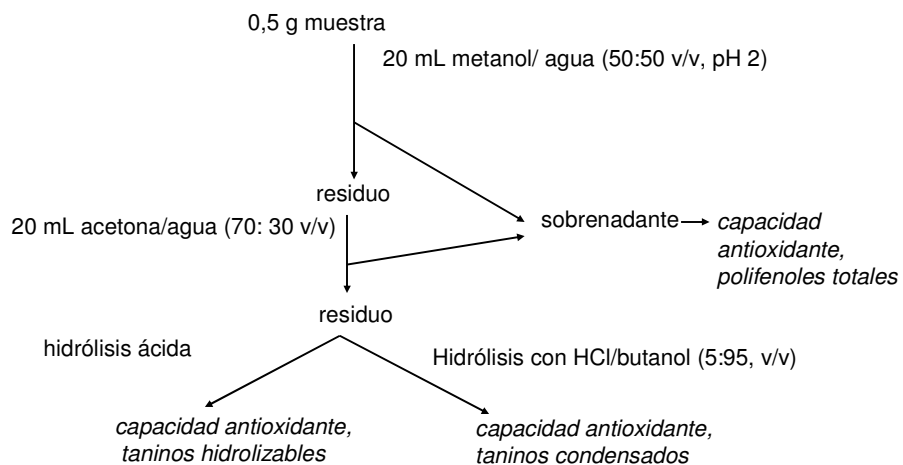
##### 2.2.1.1.1 Extracción acuoso-orgánica

La **Figura 14** muestra un esquema del procedimiento que se llevó a cabo para la extracción acuoso-orgánica de antioxidantes. 0,5 g de muestra (entre 2 y 3 en el caso del trabajo con cereales) se colocaron en un tubo de ensayo y se añadieron 20 mL de metanol/agua ácidos (50:50 v/v, pH ≈2). Los tubos se agitaron vigorosamente durante 1h. Posteriormente, se centrifugaron a 2500 g durante 10 min y se recuperaron los sobrenadantes. 20 mL de acetona/agua (70:30, v/v) se añadieron al residuo, y se repitieron la agitación y la centrifugación. Los extractos metanólicos y acetónicos se mezclaron para determinar en los mismos la capacidad antioxidante y el contenido en polifenoles totales.

El residuo de esta extracción se sometió a una hidrólisis ácida (Hartzfeld, 2000): 200 mg del residuo de la extracción acuoso-orgánica se mezclaron con 20 mL de agua y 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A continuación, las muestras se incubaron durante 20 hs a 85°C con agitación constante. Se centrifugaron (2500 g durante 10 min) y se recogieron los sobrenadantes. Después de dos lavados con agua destilada, el volumen final se llevó a 50 mL. En este sobrenadante se determinó la capacidad antioxidante y el contenido en taninos hidrolizables.

En el residuo de otra extracción acuoso-orgánica de la muestra original se llevó a cabo una hidrólisis con HCl/butanol (5:95, v/v) a 100°C durante 3 hs. En el sobrenadante obtenido se determinó la capacidad antioxidante y el contenido en taninos condensados.

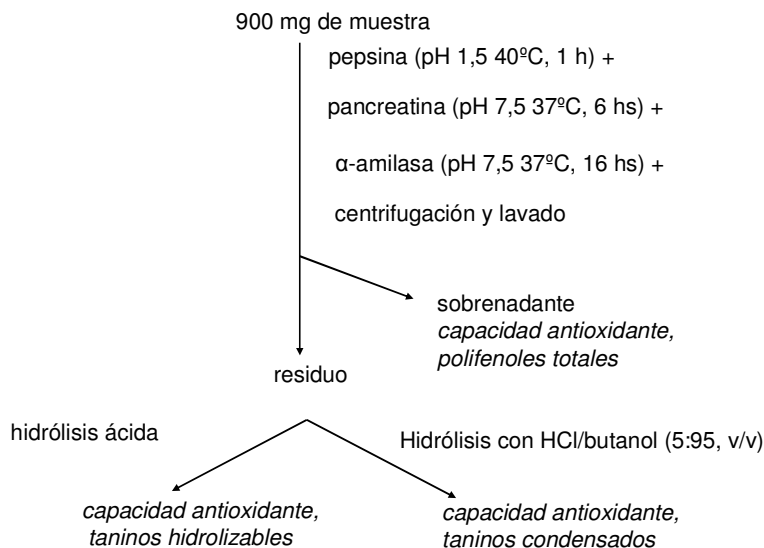




**Figura 14.** Esquema de la determinación de capacidad antioxidante a partir de una extracción acuoso-orgánica

#### 2.2.1.1.2 Extracción fisiológica *in vitro*

Se llevó a cabo usando el método *in vitro* descrito previamente por Saura-Calixto et al. (2000), que permite aislar los componentes indigeribles de los digeribles de los alimentos. Dicho procedimiento aparece de forma esquemática en la **Figura 15**.



**Figura 15.** Esquema de la determinación de capacidad antioxidante a partir de una extracción fisiológica *in vitro*

Las muestras fueron sucesivamente incubadas con enzimas digestivas para simular el proceso de la digestión en el intestino delgado. Brevemente, 900 mg de muestra (en el caso de los cereales procesados, hay que tener en cuenta que las muestras estaba liofilizadas, por lo que el peso seco era mayor) se incubaron con pepsina (0,2 mL de una solución de 300 mg/mL en un tampón de HCl-KCl 0,2M pH 1,5, 40°C, 1h), pancreatina (1 mL de una solución de 5 mg/mL en tampón fosfato 0,1M pH 7,5, 37°C, 6 h) y  $\alpha$ -amilasa (1 mL de una solución de 120 mg/mL en un tampón de tris-maleato 0,1 M, pH 7,5, 37°C, 16 h). A continuación, las muestras se centrifugaron (15 min, 3000 g) y se recogieron los sobrenadantes. Los residuos se lavaron dos veces con 5 mL de agua destilada y se unieron todos los sobrenadantes para incubarlos con 100  $\mu$ L de amiloglucosidasa durante 45 min a 60°C. En estos sobrenadantes se determinó el contenido en capacidad antioxidante y en polifenoles totales.

Los residuos de estas extracciones se sometieron a los mismos tratamientos que los de la extracción acuoso-orgánica, para determinar capacidad antioxidante y contenido en taninos hidrolizables y taninos condensados.

## **2.2.1.2 Determinación de compuestos antioxidantes**

### **2.2.1.2.1 Polifenoles extraíbles**

Los polifenoles totales se determinaron de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999) Las muestras (0,5 mL) se mezclaron con 0,5 mL de reactivo Folin y se agitaron. Después de 3 min., se añadieron 10 mL de carbonato de sodio (75 g/L) y 14 mL de agua destilada y se agitó invirtiendo los tubos varias veces. Después de 1 h, se midió la absorbancia a 750 nm. Los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico, para lo que previamente se había elaborado una curva de calibrado de ácido gálico con concentraciones de 5-25 mg/L

### **2.2.1.2.2 Taninos hidrolizables**

En el sobrenadante obtenido tras la hidrólisis ácida del residuo de la extracción acuoso-orgánica se determinó el contenido en taninos hidrolizables por el método Folin.

### **2.2.1.2.3 Taninos condensados**

En el sobrenadante obtenido tras la hidrólisis con HCl/butanol (5:95, v/v) del residuo de la extracción acuoso-orgánica se determinó el contenido en taninos condensados, midiendo la absorbancia a 538.5 nm (Reed et al., 1982)

### **2.2.1.2.4 Determinación de polifenoles por HPLC**

Se empleó el método descrito por Lamuela-Raventós (Lamuela-Raventós & Waterhouse, 1994) Se empleó un equipo de HPLC Hewlett-Packard 1100 con DAD acoplado a una estación de tratamiento de datos Chemstation HP 79995. La columna utilizada era una Novapack C18 (250mm x 4mm), con un tamaño de partícula de 5µm. El volumen de inyección era de 100µL. La cuantificación se llevó a cabo a 280 nm para ácidos benzoicos (expresados como ácido gálico) y para flavan-3-oles (expresados como catequinas), a 320 para ácidos hidroxicinámicos (expresados como ácido cafeico), a 365 para flavonoles (expresados como rutina) y a 520 para antocianinas (expresados como malvidina).

### 2.2.1.3 Determinación de capacidad antioxidante *in vitro*

#### 2.2.1.3.1 FRAP

Para el ensayo FRAP (Benzie & Strain, 1996; Pulido, Bravo & Saura-Calixto, 2000), 900  $\mu$ L del reactivo FRAP, que contenía TPTZ,  $\text{FeCl}_3$  y tampón acetato, se mezclaron con 90  $\mu$ L de agua destilada y 30  $\mu$ L de la muestra o el blanco (los disolventes usados para la extracción). Los valores de absorbancia a 595 nm se tomaron cada 15 s a 37°C, usando un espectrofotómetro Beckman DU-640 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, U.S.A.), equipado con una celda termostatzada. Para los cálculos del valor FRAP se tomaron las lecturas a los 30 min, dado que a los 4 min, el tiempo que se toma habitualmente, la reacción para formar el complejo Fe-TPTZ aún no ha terminado (Pulido, Bravo & Saura-Calixto, 2000)

#### 2.2.1.3.2 DPPH

La capacidad de las muestras para captar radicales libres se midió con el método DPPH<sup>\*</sup> (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995), modificado en nuestro laboratorio para determinar parámetros cinéticos (Sanchez-Moreno, Larrauri & Saura-Calixto, 1998). A 3,9 mL de una solución metabólica de DPPH, ajustada hasta tener una absorbancia de 0,7, se le añaden 0,1 mL del extracto acuoso-orgánico de la muestra. Se midió la absorbancia a 515 nm hasta que la reacción se estabilizó. El parámetro  $\text{EC}_{50}$ , que refleja la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH<sup>\*</sup>, se ha expresado en g ms/g DPPH<sup>\*</sup>. También se calcularon el tiempo necesario para alcanzar la  $\text{EC}_{50}$  ( $\text{tEC}_{50}$ ) y la eficiencia antioxidante ( $\text{AE} = 1/\text{EC}_{50} \text{ tEC}_{50}$ ). Esta forma de expresión de los resultados facilita la comparación con la bibliografía, a diferencia de la empleada por otros autores, basada en expresar el % de inhibición del DPPH<sup>\*</sup> (Yu et al., 2002), ya que este porcentaje depende de la concentración de radical y la concentración de muestra empleado en este caso y, si éstas varían entre distintos trabajos, no es posible llevar a cabo la comparación.

En el caso de la extracción fisiológica *in vitro* de cereales, debido a que el medio de reacción es metanólico, y la extracción fisiológica se lleva a cabo en un medio acuoso, cuando esto se aplicaba a los extractos fisiológicos, se producía una precipitación de proteínas y almidón. Esto se solucionó haciendo una precipitación previa con metanol y recogiendo los sobrenadantes para el ensayo.

Así mismo, en el caso de los cereales, al ser muestras con una escasa capacidad antioxidante, fue necesario modificar el procedimiento, diferentes volúmenes de los extractos (0,5 mL –1,5 mL) con la solución metanólica de DPPH<sup>•</sup> hasta alcanzar un volumen final fijo de 4 mL.

#### **2.2.1.3.3 ORAC**

Se siguió el procedimiento descrito por Ou et al. (2001) ligeramente modificado: 175  $\mu$ L de la muestra o el blanco se mezclaron con 120  $\mu$ L de PBS pH 7,4 75 mM, 205  $\mu$ L de una solución de AAPH 53 mM y 3 mL de una solución de fluoresceína 48 nM. La fluorescencia se registró hasta que llegó a cero (longitud de onda de excitación 493 nm, longitud de onda de emisión 515 nm) en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS 55, equipado con una célula termostatizada a 37°C. Los resultados se calcularon usando las diferencias de áreas bajo la curva entre el blanco y la muestra y se expresaron como equivalentes de Trolox.

#### **2.2.1.3.4 ABTS a un tiempo fijo**

Tras añadir 100  $\mu$ L de la muestra de Trolox a 3,9 mL de solución diluida de ABTS<sup>•+</sup> (10 mL de una solución de persulfato de potasio conteniendo 66 mg en 100 mL de agua destilada mezclada con 38,4 mg de ABTS y agitada toda la noche, tras lo cual la solución se diluye con metanol hasta una absorbancia final de  $0,7 \pm 0,02$ ), las medidas de absorbancia a 658 nm. se tomaron cada 20 sg usando un espectrofotómetro Beckman DU-460 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). La reacción se monitorizó durante 6 min. El porcentaje de inhibición de la absorbancia frente al tiempo se representó gráficamente, calculando el área bajo la curva entre 0 y 6 min. Para la calibración se usaron soluciones de Trolox de concentraciones conocidas (Re et al., 1999)

#### **2.2.1.3.5 ABTS expresado cinéticamente**

El radical catiónico se generó de la misma manera que para aplicar el método ABTS a un tiempo fijo. El efecto de cada antioxidante en este radical se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito por Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995) para el radical DPPH<sup>•</sup>, y modificado por Sánchez-Moreno, Larrauri & Saura-Calixto (1998). Una alícuota de metanol (0,1 mL) se añadió a una solución de 3,9 mL of ABTS<sup>•+</sup> (0,044 g/L). Las absorbancias a 515 nm se midieron en un espectrofotómetro Beckman DU-640 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA) hasta que la reacción se estabilizó. Las concentraciones de ABTS<sup>•+</sup> en el medio de reacción se obtuvieron mediante regresión lineal,

tras haber representado concentraciones conocidas del radical frente a absorbancia, tras lo cual el porcentaje de radical remanente se representó frente a la concentración de muestra para obtener el  $EC_{50}$ . También se calcularon el  $t_{EC50}$  y la eficacia antirradicálica, AE, de la misma manera que en el ensayo DPPH.

#### **2.2.1.4 Otras determinaciones**

##### **2.2.1.4.1 Fibra dietética**

Se empleó el método de Proxy et al. (1992), modificado en nuestro laboratorio (Mañas & Saura-Calixto, 1993; Mañas et al., 1994). Como cambio más significativo, se elimina la precipitación etanólica para separar la fracción de fibra soluble y se introduce la separación de esta fracción por diálisis.

La técnica consiste en una serie de tratamientos enzimáticos de la muestra ( $\alpha$ -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa) para eliminar los componentes digestibles, proteína y almidón. Posteriormente, se realizó una separación de las fracciones de fibra soluble e insoluble por centrifugación. Tras la centrifugación, se combinaron los sobrenadantes del tratamiento enzimático y los lavados y se sometieron a diálisis (en membranas de celulosa con punto de corte para peso molecular 12000-14000 Da.), para obtener de este modo la fracción de fibra soluble.

Posteriormente, se determinaron las dos fracciones de fibra, soluble e insoluble, tras las siguientes hidrólisis ácidas:

-Fibra insoluble: El residuo obtenido después del tratamiento enzimático de la muestra se sometió a una hidrólisis secuencial en ácido sulfúrico 12M a 30°C durante 1h con agitación. A continuación, se diluyó hasta obtener una concentración 1M de ácido sulfúrico y se mantuvo a 100°C durante 90 minutos en un baño con agitación continua. Se dejó enfriar y se centrifugó 15 min a 3000 rpm. En esta fracción se determinaron los azúcares neutros por cromatografía de gases, los ácidos urónicos por el método de Scout y los azúcares totales (ácidos urónicos + azúcares neutros) empleando ácido dinitrosalicílico como reactivo colorimétrico. Los residuos de la hidrólisis ácida de la fibra insoluble se secaron a 105°C durante 16 hs y se cuantificaron gravimétricamente como lignina Klason.

- Fibra soluble: La fracción de fibra dietética soluble se hidrolizó con ácido sulfúrico 1M. Se mantuvo a 100°C durante 90 min en un baño con agitación continua. En esta fracción se determinaron los azúcares neutros por cromatografía de gases, los ácidos

urónicos por el método de Scout y los azúcares totales (ácidos urónicos + azúcares neutros) empleando ácido dinitrosalicílico como reactivo colorimétrico.

El contenido en azúcares neutros se determinó por cromatografía de gases en los hidrolizados de fibra dietética soluble e insoluble, previa derivatización a sus correspondientes acetatos de alditol. Se siguió, con ligeras modificaciones, el método de Englyst y Cummings (1988).

Los ácidos urónicos se determinaron espectrofotométricamente mediante el método descrito por Scott en 1979, usando como reactivo 3,5-dimetilfenol y como patrón ácido galacturónico.

Los valores finales de fibra soluble ( $FD_s$ ), insoluble ( $FD_i$ ) y total ( $FD_t$ ) fueron determinados de la siguiente manera:

$FD_s$  = azúcares neutros + ácidos urónicos

$FD_i$  = azúcares neutros + ácidos urónicos + lignina klason

$FD_t$  = fibra soluble + fibra insoluble

#### **2.2.1.4.2 Contenido en grasa**

Se determinó gravimétricamente tras una extracción con éter de petróleo en un equipo Shoxtec.

#### **2.2.1.4.3 Contenido en proteína**

El contenido en nitrógeno se determinó en un analizador LECO FP-2000®. En este equipo, la muestra es quemada en atmósfera de oxígeno puro y los gases producidos en la combustión, una vez tratados, se seleccionan los óxidos de nitrógeno. Estos son reducidos a nitrógeno molecular, el cual puede ser detectado por conductividad térmica. Se utilizó 6,25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

#### **2.2.1.4.4 Cenizas**

El contenido en cenizas se determinó en un horno tipo mufla a 550°C hasta la obtención de cenizas blancas

### **2.2.1.5 Estadística**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Se compararon las medias de tres valores, usando un nivel de significancia de  $p < 0,05$ , mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). El programa informático empleado fue Statgraphic Computer System, version 5.1.

### **2.2.2 Ensayos *in vivo***

#### **2.2.2.1 Diseño de los experimentos *in vivo***

##### **2.2.2.1.1 Efecto en fumadores de la Fibra Antioxidante de Uva**

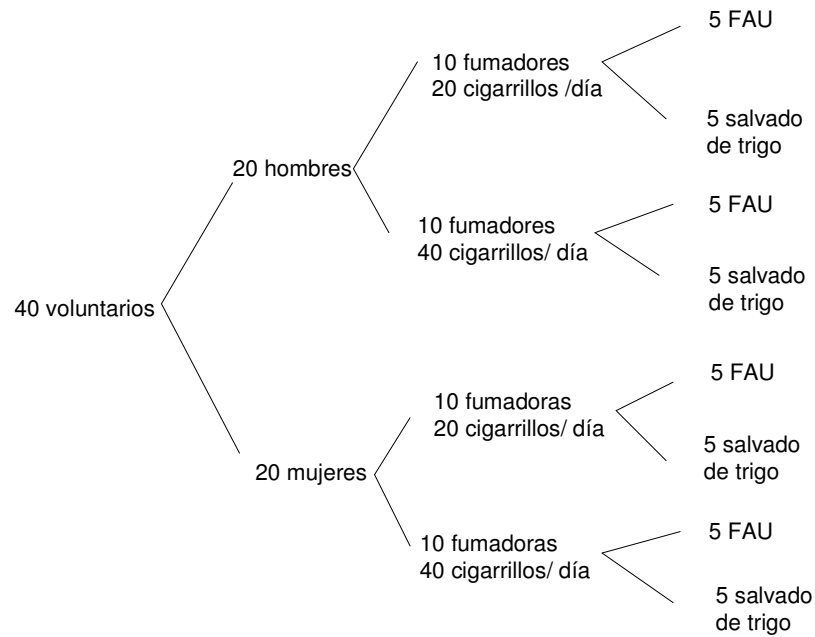
La Fibra Antioxidante de Uva fue presentada a los voluntarios en forma de producto pulverizado con un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm, en sobres monodosis de 7,5 gramos y cerrados al vacío. Así mismo, había sido sometido a esterilización con rayos  $\gamma$  (en distintas pruebas se comprobó que la acción de estos rayos no reducía de forma significativa la capacidad antioxidante de la muestra) y había superado los correspondientes controles microbiológicos. Los voluntarios debían ingerir uno de estos sobres al día.

En primer lugar, los miembros del grupo de investigación llevaron a cabo un análisis sensorial del producto, disolviéndolo/mezclándolo en los siguientes medios: agua, zumo de naranja, zumo de piña, zumo de melocotón, zumo de tomate, yogur natural, yogur con fresas. Se observó que el producto presentaba características sensoriales más agradables al ser tomado con zumo de piña o de naranja, a pesar de que no se lograba una disolución completa del mismo. Así mismo, se observó que la solubilidad se podía mejorar llevando a cabo la mezcla en un recipiente con tapadera, para agitarlo cerrado, y que tras beber el contenido del mismo sería necesario hacer un nuevo lavado con zumo para arrastrar las partículas de producto que pudieran haber quedado en el fondo.

Los voluntarios se reclutaron a partir de la Unidad de Tabaquismo del Hospital Carlos III de Madrid. Los requisitos para participar eran ser mayor de edad y fumador. Finalmente, en el estudio participaron 40 personas y su distribución se puede ver en la **Figura 16**. Se realizó un diseño doble ciego, en el que la mitad de los participantes tomaron Fibra Antioxidante de Uva y la otra mitad tomó como placebo salvado de trigo, un producto rico en fibra dietética pero sin antioxidantes. De estos 40 voluntarios, el estudio lo completaron 16



voluntarios del grupo que tomó Fibra Antioxidante de Uva y 14 voluntarios del grupo placebo.



**Figura 16.** Distribución de los participantes en el estudio sobre los efectos en fumadores de la Fibra Antioxidante de Uva

La duración del estudio fue de 1 mes. Se realizaron análisis de sangre al comenzar, a los 15 días y al mes, midiendo los parámetros que se resumen en la **Figura 17**.

RESUMEN DE LOS PARÁMETROS DETERMINADOS EN EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS EN FUMADORES DE LA INGESTA DE FIBRA ANTIOXIDANTE DE UVA

- Perfil lipídico
  - Colesterol total
  - Colesterol LDL
  - Colesterol HDL
  - Colesterol VLDL
  - Triglicéridos
- Glucosa
- Metabolismo del hierro
  - Hierro
  - Ferritina
  - Transferrina
- Ácido úrico
- Creatinina
- Proteínas totales
- Status antioxidante
  - FRAP
  - ABTS
  - MDA

**Figura 17.** Parámetros determinados en el estudio del efecto en fumadores de la ingesta de Fibra Antioxidante de Uva

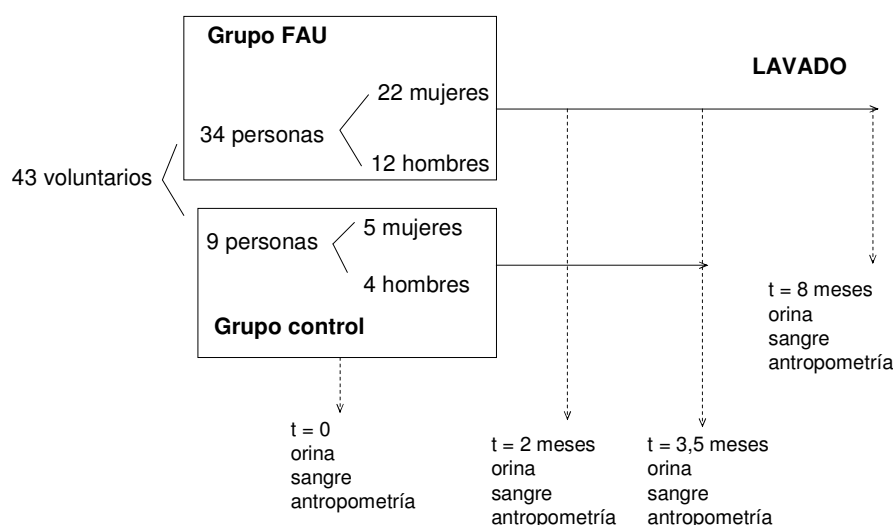
**2.2.2.1.2 Efectos en parámetros de riesgo cardiovascular de la Fibra Antioxidante de Uva**

El producto fue suministrado del mismo modo que en el ensayo realizado en fumadores, en sobres monodosis de 7,5 g, de los que se debían tomar uno al día.

Los voluntarios se reclutaron a través de carteles colocados en las facultades de la Universidad Complutense de Madrid y en distintos centros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Los requisitos para participar eran ser mayor de edad, no fumador, y en caso de tener niveles altos de colesterol, no estar tomando ningún medicamento para reducirlos, con el objetivo de eliminar posibles interferencias entre la fibra

y estos medicamentos y poder determinar, si la ingesta solamente de FAU, puede jugar un papel en la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol.

Finalmente, en el experimento participaron 34 voluntarios (22 mujeres y 12 hombres) que tomaron el producto, así como 9 controles (4 hombres y 5 mujeres), que fueron sometidos al mismo seguimiento y pruebas que los voluntarios, pero sin ingerir la FAU. La distribución de los participantes en el ensayo, así como el diseño del mismo, se puede ver en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Distribución de los participantes y diseño del ensayo sobre efecto en parámetros de riesgo cardiovascular de la ingesta de Fibra Antioxidante de Uva

Los controles se incluyeron para poder descartar variaciones en los distintos parámetros debidas a causas estacionales, y poder discernir qué variaciones se producían exclusivamente por el efecto de la ingesta de FAU, así como para poder tener en cuenta variaciones que los individuos efectúen en su estilo de vida al saber que están participando en un ensayo clínico, que se les va a hacer un seguimiento de sus hábitos dietéticos y estilo de vida, etc. Se descartó que este grupo tomara un placebo, dado que el objetivo era comprobar los efectos que podría tener en una dieta normal la incorporación de la FAU. En este sentido, el diseño se basó en numerosos estudios previos con antioxidantes de uva o vino en los que no se incluyó grupo placebo (O'Byrne et al., 2002; Simonetti et al., 2002; Estruch et al., 2004; Avellone et al., 2006; Castilla et al., 2006; Pignatelli et al., 2006), aunque sí se consideró necesario incluir un grupo control, por las razones antes explicadas

Por lo que se refiere a los niveles de colesterol de los voluntarios, 21 de los sujetos del grupo experimental eran hipercolesterolémicos y 13 normocolesterolémicos, y en los controles 4 eran hipercolesterolémicos y 5 normocolesterolémicos. Se consideró sujetos hipercolesterolémicos a aquellos con una concentración de colesterol sérico superior a 200 mg/dL. Se debe indicar que no existe un consenso respecto al nivel de colesterol sérico a partir del cual se puede hablar de una situación de riesgo. Así, la Organización Mundial para la Salud recogió, en el año 2004, que los niveles de referencia eran de 190 mg/dL en Europa y 240 mg/dL en EEUU (MacKay et al., 2004). A su vez, la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos de nuestro país consideran aceptables niveles hasta 220 mg/dL. Como valor de compromiso se eligieron los 200 mg/dL, considerando también que, al buscar sujetos que no estuvieran medicamentándose por esta causa, cuanto más alto fuera el umbral elegido, más complicado sería encontrar voluntarios con esta característica.

La duración del estudio fue de 3,5 meses. Se realizaron análisis de sangre y orina al comenzar, a los 2 meses y a los 3,5 meses, midiendo los parámetros posteriormente indicados. En estas tres ocasiones también se llevaron a cabo medidas antropométricas, así como de la presión sanguínea.

A los 4 meses de la finalización de la ingesta de la FAU se realizó una nueva toma de muestras de sangre y orina, con el objetivo de ver si los efectos observados debido a la ingesta de la FAU se mantienen tras un periodo de lavado o si, por el contrario, es necesaria una ingesta regular para que tenga lugar un mantenimiento de estos efectos. En dichos análisis participaron 23 de los sujetos del grupo FAU. En este nuevo análisis sólo se midieron aquellos parámetros en los que se habían observado diferencias significativas durante el periodo de ingesta de la FAU.

Antes de comenzar el estudio, se tuvo una entrevista personal con cada voluntario. En dichas entrevistas, se les proporcionó un folleto explicativo sobre el ensayo clínico (**Figura 19**), así como un recipiente con tapa en el que tomar la FAU mezclada con zumo. Se les dieron instrucciones de no modificar sus hábitos dietéticos ni estilo de vida durante la duración del estudio, así como de no tomar en un día más de un sobre de FAU, aun en caso de olvido el día previo. En dichas entrevistas, también se les proporcionó un formulario de recordatorio de deposiciones, con el objetivo de que fueran apuntando el número diariamente.

## INSTRUCCIONES PARA EL ANALISIS

Acudir en ayunas (14 hs.).

Traer la primera orina del día en el bote que se les suministrará.

Vestir ropa ligera (manga corta) para la medida de peso

Para la medida de grasa corporal, será necesario descalzarse (se recomienda no traer medias o panties)

Los análisis se realizarán en la **Facultad de Farmacia** de la **Universidad Complutense de Madrid** (M/ Ciudad Universitaria), en el Departamento de Nutrición y Bromatología I, planta 3ª.

Persona de contacto:

**Dra. Isabel Goñi.**

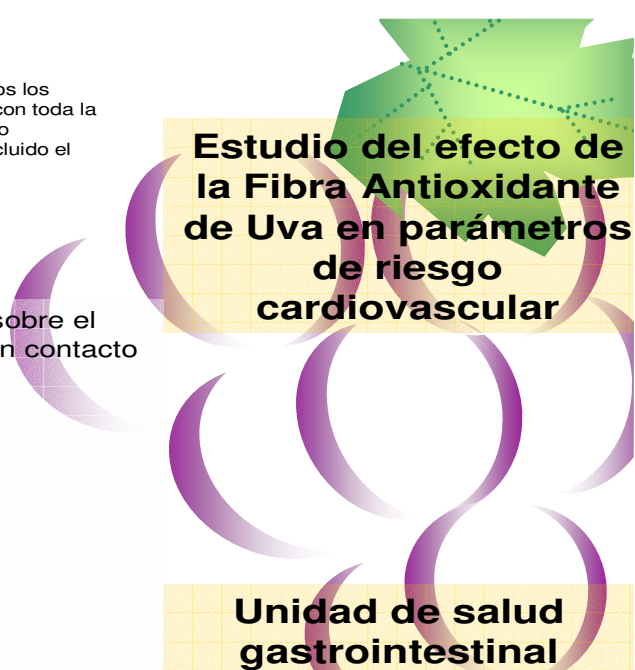
**RESULTADOS:** Al finalizar el estudio, todos los voluntarios recibirán un informe completo con toda la información antes reseñada y cómo han ido evolucionando los distintos parámetros, incluido el colesterol.

Si usted tiene cualquier duda sobre el estudio, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

- Jara Pérez
- Sara Arranz
- María Tabernero
- José Serrano
- Mª Elena Díaz

Teléfono: 915445607 ext. 281

*Somos conscientes del esfuerzo y la constancia necesarios para completar este estudio. Por eso, agradecemos plenamente su ayuda y colaboración.*



**Estudio del efecto de  
la Fibra Antioxidante  
de Uva en parámetros  
de riesgo  
cardiovascular**

**Unidad de salud  
gastrointestinal**

Departamento de Metabolismo y  
Nutrición, Instituto del Frío, CSIC.

Facultad de Farmacia, Departamento  
de Nutrición y Bromatología I  
Universidad Complutense de Madrid

Calle José Antonio Novais 10,  
28040, Madrid



**OBJETIVO DEL ESTUDIO:** En los últimos años, en los países desarrollados se ha producido un gran aumento de las enfermedades cardiovasculares. Se ha demostrado que están relacionadas con malos hábitos dietéticos, falta de actividad física, tabaco, etc. En nuestro laboratorio estudiamos el efecto que ciertos productos naturales pueden tener en la prevención de estas enfermedades, así como en los niveles de colesterol. Uno de estos productos es la Fibra Antioxidante de Uva.



**PRODUCTO: LA FIBRA ANTIOXIDANTE DE UVA** es un producto natural obtenido a partir de uva. Su componente mayoritario es fibra (78%). La fibra dietética posee múltiples efectos beneficiosos para el organismo, como regulación del tránsito intestinal, disminución de la absorción de grasas de los alimentos, modulación de la flora colónica, etc. Además, la Fibra Antioxidante de Uva posee un alto contenido en antioxidantes naturales. Los antioxidantes, presentes en los alimentos vegetales, se han relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer (como el de colon) y enfermedades neurodegenerativas.

Los antioxidantes presentes en la Fibra Antioxidante de Uva son estructuralmente similares a los del vino tinto, que han mostrado ser un factor significativo en la prevención de riesgos cardiovasculares en diversos estudios epidemiológicos.

La Fibra Antioxidante de Uva NO es un medicamento, sino un suplemento dietético. Las cantidades diarias que se tomarán durante este estudio equivalen aproximadamente al 20% de la ingesta diaria recomendada de fibra. Esta cantidad de fibra es la que contiene, por ejemplo, un tazón de cereales ricos en fibra o medio tazón de salvado de trigo. Sin embargo, la fibra de uva tiene un alto contenido de antioxidantes, lo que puede tener efectos positivos en el organismo.

La Fibra Antioxidante de Uva se está utilizando en otro estudio del Plan Nacional de I+D (Ministerio de Educación y Ciencia) desarrollado en el Hospital Duran i Reinalds de Barcelona. Así mismo, se utilizó en otro estudio con fumadores, ya concluido, realizado en colaboración con el Hospital Carlos III de Madrid.



**ESTUDIO:** En el estudio van a participar hombres y mujeres adultos, sanos, no fumadores, con distintos niveles de colesterol y que no tomen ningún medicamento para reducir el colesterol. Forma parte de un estudio más amplio dirigido por el Hospital Duran i Reinalds de Barcelona, financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia.



**PARÁMETROS A ESTUDIAR:** A los voluntarios se les realizarán análisis de sangre y orina al comienzo del estudio (antes de tomar la Fibra Antioxidante de Uva) y a los 2 y 4 meses de su inicio. En estas muestras se efectuará una analítica completa, en la que, además de medir los niveles de colesterol, se determinarán otros parámetros de función renal, hepática, etc. También se medirán una serie de parámetros de riesgo cardiovascular que, en estos momentos, no se realizan rutinariamente en nuestro país. Estos parámetros están relacionados, por ejemplo, con el grado de oxidación de las grasas en el organismo, o con el grado de desarrollo de la inflamación arterial, proceso que tiene lugar en las primeras etapas de la arterioesclerosis. Otro aspecto que se estudiará es el efecto de la fibra en el tránsito intestinal. Además, se realizará una evaluación nutricional y antropométrica; los días en que se realicen las extracciones sanguíneas, se realizarán medidas de altura, el peso y el % de grasa corporal. Así mismo, periódicamente se les realizarán encuestas telefónicas sobre la ingesta de alimentos del día anterior. Es necesario poseer suficientes encuestas de este tipo para poseer un conocimiento real de los hábitos dietéticos de una persona, dada la variabilidad que puede haber entre unos días y otros.

**Instrucciones de consumo:** La Fibra Antioxidante de Uva se tomará diariamente (7,5 g.) durante 4 meses. Se proporcionará en sobres monodosis.

<p>1</p>	<p>Tras verter un vaso de zumo de piña (también se puede tomar en zumo de naranja o yogur) en el recipiente proporcionado, se añadirá el contenido total del sobre.</p>	<p>2</p> <p>La Fibra Antioxidante de Uva cambiará el color del zumo debido a los colorantes naturales de la uva. Agitar antes de consumir con ayuda de la tapadera.</p>	<p>3</p> <p>Las partículas quedarán en suspensión, es decir, no se disolverá por completo, por lo que será conveniente añadir otro vaso de zumo para arrastrar las partículas restantes.</p>	<p>4</p> <p>El producto se debe tomar preferentemente por la mañana; dado su efecto saciante, en cualquier caso se debe tomar antes de realizar una comida y no al final.</p> <p>Si olvida tomar la dosis a la hora habitual, puede tomarla a otra hora. Sin embargo, no debe juntar dos dosis en un mismo día.</p> <p>Por favor, no modifique sus hábitos.</p>
----------	---	---	--	---

**Figura 19.** Folleto explicativo que se entregó a los voluntarios antes de comenzar el ensayo clínico

En esta primera entrevista, también se les hizo una encuesta básica sobre su estado de salud, estilo de vida y actividad física, consumo de alcohol y de qué tipo, etc., con el fin de obtener una información lo más completa posible sobre el estado de salud inicial y los hábitos del individuo.

Las características generales de la población estudiada, extraídas a partir de estas encuestas iniciales, aparecen en la **Tabla 2**. Se puede observar que la población control y la experimental resultaron bastantes similares en lo que se refiere a edad, ausencia de consumo regular de suplementos vitamínicos y actividad física, siendo ésta básicamente leve, aunque en el grupo de las mujeres controles predominaban las que desarrollaban una actividad física moderada. Los dos grupos presentaban ciertas diferencias en el IMC que, mientras en el grupo control se mantenían entre los valores considerados normales, en el grupo de voluntarios estaban en un nivel de sobrepeso, especialmente en el caso de voluntarios hombres.

	global voluntarios	global controles	voluntarios hombres	controles hombres	voluntarios mujeres	controles mujeres
Nº participantes	34	10	12	22	5	5
edad	32,8 + 12,1	34,6 + 12,4	34,4 + 14,1	34,7 + 16,4	31,4 + 10,1	34,4 + 10,3
IMC	26,1 + 4,7	22,7 + 2,4	27,6 + 5,6	24,1 + 2,5	24,6 + 3,8	21,4 + 1,5
Nº partic. consumo regular de suplementos vitamínicos	2	0	0	0	2	0
<b>actividad física:</b> leve	70%	60%	90%	80%	70%	40%
moderada	30%	40%	10%	20%	30%	60%
alta	0	0	0	0	0	0
% que utiliza aceite de oliva como aceite de cocina	59%	50%	58%	40%	68%	80%
% que consume de anticonceptivos orales	---	---	---	---	41%	20%
<b>consumo de vino</b>	76%	100%	75%	100%	100%	100%
2 o menos consumiciones/semana*	9%	0	8%	0	0	0
de 3 a 7 consumiciones/semana	15%	0	17%	0	0	0
más de 7 consumiciones/semana						
<b>consumo de cerveza</b>	65%	100%	50%	100%	75%	100%
2 o menos consumiciones/semana *	15%	0	17%	0	14%	0
de 3 a 7 consumiciones/semana	20%	0	33%	0	9%	0
más de 7 consumiciones/semana						
<b>consumo de bebidas de alta graduación alcohólica</b>	88%	60%	83%	80%	91%	40%
1 o menos consumiciones/semana*	12%	40%	17%	20%	9%	60%
de 2 a 4 consumiciones/semana	0	0	0	0	0	0
más de 4 consumiciones/semana						

**Tabla 2.** Características iniciales de la población estudiada

Las consumiciones de vino y bebidas de alta graduación alcohólica tienen un volumen de 150 mL, mientras que las de cerveza lo tienen de 200 mL



También se realizaron preguntas sobre la grasa utilizada mayoritariamente en la cocina, a lo que en torno al 50% de la población respondió que utilizaba siempre oliva (% que aumenta en el caso de las mujeres, tanto controles como experimentales), mientras que la otra mitad usaba girasol o alternaba oliva con girasol. Así mismo, se les inquirió sobre su consumo de bebidas alcohólicas. Como se puede ver en la **Tabla 2**, ninguna de las mujeres participantes y sólo un pequeño porcentaje de los hombres era consumidor habitual de vino, alimento del que se conoce que posee un alto contenido en antioxidantes. El consumo regular de cerveza resultó ser algo mayor, especialmente entre los voluntarios hombres y el consumo de bebidas de alta graduación alcohólica era prácticamente nulo.

A lo largo del ensayo, se realizó un seguimiento telefónico semanal, preguntando el número de deposiciones de la semana anterior, así como posibles complicaciones que hubieran podido aparecer debido a la ingesta de la FAU. Ningún voluntario relató ningún problema significativo y no se produjo ningún abandono a lo largo del ensayo.

Se les indicó a los voluntarios que, a lo largo del estudio, siguieran con su dieta habitual. Este es un aspecto importante, ya que, a pesar de que algunos ensayos de intervención restringen en sus voluntarios el consumo de productos ricos en antioxidantes, con el objetivo de discernir más claramente el efecto del suplemento proporcionado, esto puede llevar a resultados engañosos. Young et al. (2000), por ejemplo, siguiendo un procedimiento de este tipo en la suplementación con extractos de piel de uva, encontraron al final del estudio un aumento del MDA plasmático que atribuyeron a la propia dieta baja en flavonoides. En definitiva, dado que estos suplementos dietéticos serían incorporados a una dieta habitual, se trata de ver sus efectos sobre la base del mantenimiento de la misma.

Con el fin de conocer los hábitos dietéticos de los participantes, así como si estos se podían haber modificado debido a la ingesta de la FAU, se realizaron recordatorios de 24 hs. tanto antes de empezar (2 recordatorios), como a lo largo del ensayo (10 recordatorios). Dichos recordatorios se llevaron a cabo de forma aleatoria en distintos días de la semana, y considerando tanto días laborables como festivos. Al realizar los mismos, se intentaba que las personas precisaran en lo posible las cantidades ingeridas, las bebidas tomadas, el consumo de pan, los posibles consumos de snacks, helados, etc., entre horas, intentando, al mismo tiempo, no condicionarles en las respuestas.

Al terminar el ensayo, los voluntarios rellenaron una encuesta sobre las características sensoriales de la FAU, su percepción subjetiva de sus efectos, etc. Así

mismo, cada voluntario recibió un informe completo con los resultados obtenidos a lo largo de todo el ensayo.

Finalmente, en la **Figura 20** aparece un resumen de todos los parámetros determinados en este estudio.

RESUMEN DE LOS PARÁMETROS DETERMINADOS EN EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS EN PARÁMETROS DE RIESGO CARDIOVASCULAR DE LA INGESTA DE FIBRA ANTIOXIDANTE DE UVA

- Parámetros antropométricos
  - Índice de Masa Corporal
  - % grasa corporal
- Encuestas dietéticas
  - Evolución en la ingesta de raciones de cereales y legumbres, verduras, frutas, lácteos, carnes y pescados
  - Evolución en la ingesta calórica, ingesta total, ingesta de sólidos e ingesta de líquidos
  - Evolución de la ingesta de glúcidos totales, azúcares sencillos, sacarosa, fibra dietética soluble, fibra dietética insoluble, fibra dietética total
  - Evolución en la ingesta de lípidos totales, colesterol, ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados
  - Evolución en la ingesta de proteínas totales, índice lisina/arginina
  - Evolución en la ingesta de vitaminas: A, D, E, K, B1, B2, niacina, B6, B12, ácido fólico, ácido pantoténico, biotina
  - Evolución en la ingesta de minerales: Ca, Fe, I, Mg, Zn, Na, K, Cr, Se, Cl, P
  - Evolución en la ingesta de compuestos lipídicos bioactivos: carotenos, campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, ácidos grasos  $\omega$ 3
  - Evolución en la ingesta de alcohol
- Tránsito intestinal (número de deposiciones semanales)
- Estado nutricional
  - Hemoglobina
  - Hematocrito
  - Urea
  - Creatinina
  - Proteína
  - Calcio
  - Hierro
  - Fósforo
  - Presencia o ausencia de acetona en orina

- Inmunología: leucocitos, linfocitos, MXD
- Concentración de plaquetas
- Glicemia
  - Glucosa
  - Hemoglobina glicosilada
- Perfil lipídico
  - Colesterol total
  - Colesterol-HDL
  - Colesterol-LDL
  - HDL
  - Triglicéridos
- Función hepática
  - GOT/AST
  - GPT/ALT
  - GGT
  - Bilirrubina
- Presión arterial sistólica y diastólica, n<sup>º</sup> pulsaciones/minuto
- Ácido úrico
- Marcadores de inflamación
  - Fosfatasa alcalina
  - Proteína C reactiva ultrasensible
  - Fibrinógeno
  - Homocisteína
  - Neopterina en orina
- Marcadores de status antioxidante
  - Capacidad antioxidante plasmática por el método FRAP
  - Capacidad Antioxidante plasmática por el método ABTS
  - MDA
- Metabolización de polifenoles
  - Polifenoles totales en orina por el método Folin
  - Quercetina en orina
  - Equol en orina

**Figura 20.** Resumen de los parámetros determinados en el estudio sobre los efectos en parámetros de riesgo cardiovascular de la ingesta de Fibra Antioxidante de Uva (los parámetros bioquímicos se determinaron en plasma o suero, a menos que se indique que se determinaron en orina)

## **2.2.2.2 Status antioxidante**

### **2.2.2.2.1 FRAP**

Para determinar la capacidad antioxidante en plasma por el método FRAP, se siguió el mismo protocolo previamente descrito para extractos de alimentos, tomando 30  $\mu$ L de plasma, incubándolos con el reactivo FRAP a 37°C durante 30 min. y midiendo el cambio en la absorbancia a 595 nm.

### **2.2.2.2.2 ABTS**

Para determinar la capacidad antioxidante en plasma por el método ABTS, se siguió el protocolo descrito para extractos de alimentos, aunque en este caso se tomaron 3 mL de la solución del radical catiónico y 10  $\mu$ L de plasma. Igualmente, la absorbancia se midió a 730 nm, para evitar la interferencia de compuestos específicos del plasma.

### **2.2.2.2.3 MDA**

Para determinar por HPLC este marcador de oxidación lipídica, se siguió el protocolo descrito por Young et al. (1999): a 150  $\mu$ L de plasma se le añadieron 15  $\mu$ L de BHT 12 mM en etanol y 15  $\mu$ L de NaOH 6 M. Se incubó 30 min a 60 °C, para hidrolizar el MDA que estaba unido a proteínas y tenerlo todo en su forma libre.

Se añaden 300  $\mu$ L de TCA 25% y 300  $\mu$ L de TBA 1% (con NaOH 0,3%), para precipitar la proteína con el primero y derivatizar el MDA con el segundo. Se incubó 45 min. a 90°C, se centrifugó 10 min. a 10.000 g, se recogen los sobrenadantes y se pasan a un vial de HPLC.

Las condiciones de HPLC son las siguientes: columna C18 250\*4.6NM 5  $\mu$ m, flujo 0,9 mL/min y detección a 532 nm. Se efectúa un gradiente durante 17 min, empezando con un 100% de agua y llegando a un 70% de acetonitrilo con 0,1% de TFA. En 3 minutos se vuelve a las condiciones iniciales, siendo el tiempo total de análisis de 20 min.

El calibrado se llevó a cabo con soluciones de concentraciones conocidas de TEP.

#### **2.2.2.2.4 Determinación de polifenoles totales en orina**

Los polifenoles totales en la orina se determinaron espectrofotométricamente siguiendo un protocolo descrito recientemente por Roura et al., 2006, adaptación del método Folin. Los polifenoles se extrajeron de la orina con cartuchos SPE Waters Oasis HLB 3 MI (60 mg) previamente activados, a los que se les añadió 1 mL de la orina. El cartucho se lavó con 2 mL de ácido fórmico 1,5 M y con 2 mL de agua: metanol 95:5 (v/v). Los polifenoles se eluyeron con 1 mL de metanol conteniendo un 0,1% de ácido fórmico.

200  $\mu$ L de esta fracción se mezclaron con 140  $\mu$ L de reactivo Folin diluidos en 2,4 mL de agua y con 420  $\mu$ L de carbonato sódico 20%. La mezcla se incubó 1 h. a temperatura ambiente, 910  $\mu$ L de agua se añadieron a la mezcla y la absorbancia se determinó a 765 nm.

El contenido en polifenoles se expresó en mg catequina/g creatinina, tras haber determinado espectrofotométricamente el contenido en creatinina por el método de Jaffé y haber utilizado soluciones de concentraciones conocidas de catequina en una “orina sintética” para la calibración

#### **2.2.2.3 Marcadores de inflamación**

##### **2.2.2.3.1 Fosfatasa alcalina**

Se trata de una enzima producida en el hígado. Aunque es un marcador de inflamación, sólo se observa un aumento de sus niveles en sangre en el caso de inflamación en ciertas zonas, como el hígado, donde la inflamación afecta a una zona muy grande. En el caso de inflamación arterial, al ser las placas de ateroma tan pequeñas, no se detecta un aumento de esta enzima en plasma, salvo en casos en los que se llegue a producir un accidente cardiovascular. Fue determinada en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

#### **2.2.2.3.2 Fibrinógeno**

Es una glicoproteína precursora de la fibrina, proteína que participa en el proceso de coagulación junto con las plaquetas. Al igual que en el caso de éstas, niveles elevados se han asociado con un aumento del riesgo cardiovascular. Fue determinado en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

#### **2.2.2.3.3 Proteína C reactiva ultrasensible**

La Proteína C reactiva es un marcador inflamatorio sintetizado inicialmente por hepatocitos en respuesta a la interleukina 6, el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral y otras citokinas, cuyos niveles aumentan en placas aterioescleróticas. Fue determinada en el laboratorio del Dr. Echevarne, en Madrid.

#### **2.2.2.3.4 Homocisteína**

Se determinó por HPLC siguiendo el método descrito por Frick et al., 2003. A 60  $\mu$ L de plasma o de una solución de concentración conocida de homocisteína, se le añaden 30 $\mu$ L de TCEP 10% (para liberar la homocisteína asociada a proteínas y tener toda la homocisteína en su forma libre) y 10  $\mu$ L de PBS, y se incuban 15 min. a 37°C. A continuación, la proteína se precipita con 90  $\mu$ L de TCA 10% conteniendo AEDT 1 mM, las muestras se centrifugan 10 min. a 4000 *g* y se recogen 50  $\mu$ L del sobrenadante, que se añaden a eppendorfs previamente preparados con 125  $\mu$ L de tampón borato pH 9,5, 10  $\mu$ L NaOH 1,55 M y 50  $\mu$ L SBD-F (1g/L en tampón borato). Se incubó 60 min. a 80°C en la oscuridad y las muestras se transfieren a viales de HPLC.

Las condiciones de HPLC son las siguientes: columna de fase reversa 55-mm RP<sub>18</sub> LiChroCART 55-4 y precolumna RP<sub>18</sub> todas de Merck. Flujo de 1,5 mL/min, volumen de inyección de 30  $\mu$ L, tiempo de análisis de 6 min. Se utilizó un equipo Agilent 1100 con detector de fluorescencia, empleando una longitud de onda de emisión de 515 nm y de excitación de 385 nm. Como fase móvil, se empleó KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M pH 2.7 con 5% metanol

#### **2.2.2.3.5 Neopterina**

Se empleó el procedimiento descrito por Fuchs, Werner & Wachter, 1992: La orina se diluyó 10 veces en un tampón que llevaBa 2 g de Titriplex III en 1 L de fase móvil (30 mL de tampón fosfato (0,015 M pH 6.4: 102,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 57,1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  trihidratado en 1 L de agua) que se diluyen diariamente en 2 L de agua) y se inyectó directamente.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna de fase reversa 55-mm RP<sub>18</sub> LiChroCART 55-4 y precolumna RP<sub>18</sub> todas de Merck. Flujo de 10,8 mL/min, volumen de inyección de 10 µL, tiempo de análisis de 9 min. Los resultados se expresan en µmol neopterina/mol creatinina, para tener en cuenta la densidad de la orina, tras haber realizado curvas de calibrado de los dos compuestos. La neopterina se determinó con detector de fluorescencia (longitud de onda de emisión de 438 nm y de excitación de 353nm, tiempo de retención 4 min.). La creatinina se determinó con detector DAD, a una longitud de onda de 235 nm y un tiempo de retención de 2,8 min.

#### **2.2.2.4 Otros parámetros**

Como se ha indicado anteriormente, las siguientes medidas fueron realizadas en el Laboratorio de Análisis clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y en el Hospital Carlos III de Madrid, mediante los procedimientos utilizados rutinariamente en este tipo de análisis. A continuación se describe brevemente su significado biológico y las razones para su inclusión en este estudio.

##### **2.2.2.4.1 Estado nutricional**

Se midieron varios indicadores del estado nutricional global y de la presencia de posibles déficits nutricionales, como son las proteínas plasmáticas (g/dL), el hematocrito (% de volumen de la sangre ocupado por los hematíes) o la posible presencia de acetona en orina. Así mismo, se determinaron la urea y la creatinina sanguíneas (mg/dL), ya que un exceso de las mismas puede indicar una alteración en la función renal.



Por otro lado, dado que se ha indicado como un posible efecto adverso de la fibra y de los polifenoles por su capacidad de secuestrar ciertos metales o iones, con las consecuencias que esto tendría para el estado nutricional de un individuo, se determinaron los niveles plasmáticos de ciertos micronutrientes, como calcio, fósforo y hierro (expresados todos en mg/dL), así como de hemoglobina, proteína presente en los eritrocitos y responsable del transporte de oxígeno, y que es la forma en la que se presentan dos tercios del hierro presente en el organismo. Para profundizar más en los posibles efectos de la Fibra Antioxidante de Uva en el metabolismo del hierro, en el estudio en fumadores se determinaron también los niveles de transferrina –principal proteína fijadora de hierro circulante- y de ferritina (ng/mL) –principal proteína de almacenamiento de hierro.

#### **2.2.2.4.2 Inmunología**

Con el fin de conocer la existencia de algún posible episodio de infección o de alteración del sistema inmune en el individuo, se determinaron los porcentajes de leucocitos totales, de la categoría específica de linfocitos y la fórmula XMD, que corresponde a la medida del porcentaje de basófilos, eosinófilos y monolitos.

#### **2.2.2.4.3 Glicemia**

Se determinó la glucosa libre (mg/dL) y, como esta medida está muchas veces influenciada por la ingesta del día previo, se analizó también el % de hemoglobina glicosilada. Esta medida se basa en el hecho de que la glucosa se combina con la hemoglobina (proteína responsable del transporte del oxígeno) continuamente y de manera casi irreversible durante el tiempo de vida de los hematíes (120 días). Por lo tanto la hemoglobina glucosilada será proporcional al nivel plasmático medio de glucosa durante las 6-12 semanas previas y se consideró que podría proporcionar una información más completa sobre los efectos de la Fibra Antioxidante de Uva en el metabolismo glucídico a lo largo del tiempo.

#### **2.2.2.4.4 Perfil lipídico**

Se determinaron algunos de los parámetros que han mostrado una relación más clara con la predisposición a sufrir enfermedades cardiovasculares, como son el colesterol total (mg/dL), el colesterol HDL (mg/dL), el colesterol LDL (mg/dL), el

colesterol VLDL (mg/dL) la relación colesterol HDL/colesterol LDL y los triglicéridos (mg/dL).

#### **2.2.2.4.5 Concentración de plaquetas**

Se midió un parámetro que, aunque en la práctica médica habitual se puede determinar con otros fines, es un indicador de riesgo cardiovascular, como es la concentración de plaquetas en plasma, expresada en  $10^3$  unidades / $\mu$ L.

#### **2.2.2.4.6 Función hepática**

Se determinaron tres enzimas indicadoras de diversas alteraciones en la función hepática si sus niveles se encuentran por encima de lo normal, como son GOT/AST (Transaminasa glutamicooxalacética o Aspartato aminotransferasa), GPT/ALT (Transaminasa Glutámico Piruvica o Alanina aminotransferasa) y GGT (gammaglutamiltransferasa), expresadas todas en U/L. Por otro lado, en casos de obesidad la GPT/ALT se encuentra incrementada, mientras que la AST mantiene niveles normales.

También se midieron los niveles de bilirrubina (mg/dL), un producto derivado de la ruptura del grupo hemo durante su proceso de reciclaje en el hígado y cuyos niveles también se ven incrementados en caso de alteraciones hepáticas.

#### **2.2.2.4.7 Presión arterial**

Se determinaron las presiones sistólica y diastólica, así como el número de pulsaciones por minuto.

#### **2.2.2.4.8 Ácido úrico**

Se midieron los niveles de ácido úrico en sangre (mg/100 mL). Niveles elevados del mismo pueden estar relacionados con una insuficiencia renal o con una dieta inadecuada, con un elevado consumo de embutidos, carnes rojas y marisco.

Por otro lado, se decidió incluir la determinación de este parámetro al haberse planteado que puede actuar como una interferencia en la determinación de capacidad

antioxidante en plasma (Wirleitner et al., 2003), con el objetivo de ver la posible relación entre ambos factores.

#### **2.2.2.5 Evaluación dietética**

Las encuestas realizadas fueron procesadas mediante el programa informático DIAL (elaborado por el Departamento de Nutrición y Bromatología I, de la Universidad Complutense de Madrid), que proporcionó la información necesaria para poder estudiar las evoluciones en las ingestas de macro y micronutrientes, ingesta calórica e ingesta total, así como ingestas de raciones de distintos grupos de alimentos entre los participantes del estudio durante los meses que duró el mismo.

#### **2.2.2.6 Medidas antropométricas**

Tras tallar y pesar a los voluntarios, se determinó su Índice de Masa Corporal,  $IMC = \text{Peso (kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (cm)}$

El % de grasa corporal se determinó por bioimpedancia. A pesar de que esta medida lleva asociado un error mayor que la medida de pliegues subcutáneos, debido a todos los factores que pueden influir en ella (consumo de alcohol el día antes del análisis, momento del ciclo menstrual, deshidratación debida a la práctica de ejercicio físico el día anterior, etc.), se optó por este procedimiento porque permitía realizar las medidas de manera más rápida y que fueran llevadas a cabo por distintos investigadores, mientras que las medidas de pliegues se pueden ver más afectadas si son llevadas a cabo por varias personas.

#### **2.2.2.7 Estadística**

Los resultados se procesaron utilizando el programa estadístico SPSS 13.0. En cada uno de los grupos (control y experimental), se aplicó la prueba t de Student para muestras relacionadas entre los distintos intervalos de tiempo (0-2 meses, 2-3,5 meses y 0-3 meses). La razón por la que se escogió este test se debe a que es un estadístico útil para contrastar medidas de variables que se han medido varias veces en los mismos sujetos, o, lo que es lo mismo, para medir la evolución en un parámetro comparando cada sujeto respecto de sí mismo, ya que, en parámetros fisiológicos, con una gran variabilidad interindividual, puede resultar poco útil la comparación basada en las medias y desviaciones estándares globales.

A su vez, con el fin de observar variaciones en algún subgrupo que no se produjeran en la población global, el grupo experimental se sometió a divisiones según la edad, el % de grasa corporal, el sexo y los niveles de colesterol al inicio del estudio, aplicando después el mismo tratamiento estadístico en cada una de las clasificaciones.

Para las medidas realizadas en el laboratorio, que se hicieron por triplicado para cada una de las muestras, se representó después la media de cada muestra frente a los valores de cada una de las réplicas. A continuación, aplicando una regresión lineal mediante el programa SPSS, se halló el error típico de la estimación y la media general (valor medio de todos los valores medios). Considerando que, si el error típico de la estimación fuera igual a la media general, el error asociado sería del 100%, se obtuvo el error asociado al método y variaciones por debajo de este error no se tuvieron en cuenta.



### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### **3.1 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ASOCIADA A EXTRACTOS ACUOSO-ORGÁNICOS**

Los efectos potencialmente beneficiosos para la salud que los antioxidantes han mostrado tener en numerosos ensayos *in vitro*, han provocado un interés creciente por la búsqueda de fuentes naturales de estos compuestos. Aunque, habitualmente, los alimentos más estudiados han sido ciertas frutas y hortalizas (ciruela, frutas del bosque, tomate, etc.), así como algunas bebidas (sobre todo, el vino y el té) un gran número de artículos recientes han descrito la capacidad antioxidante de diferentes cereales.

Los cereales más analizados, ya sea en forma de materias primas, o en productos elaborados de los que son constituyentes principales, han sido la avena (Emmons et al., 1999; Handelman et al., 1999; Peterson, 2001; Gray et al., 2002; Peterson et al., 2002; Bratt, 2003; Visciti et al., 2004; Nam et al., 2005; Pellegrini et al., 2006), el trigo (Zielinski, 2000; Yu et al., 2002a; Yu et al., 2002b; Yu et al., 2002c; Adom, 2003; Yu et al., 2003; Yu et al., 2004; Zhou & Yu 2004a; Zhou & Yu 2004b; Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005; Yu & Zhou, 2005; Yu et al., 2005; Yuan, 2005; Pellegrini et al., 2006) y el arroz (Xu, 2001; Adom & Liu, 2002; Zhou et al. 2004c; Iqbal, Bhanger & Anwar, 2005; Nam et al., 2005; Pellegrini et al., 2006). Respecto a los productos elaborados, se han publicado trabajos básicamente sobre distintas harinas, pan y cereales de desayuno. Así mismo, se han realizado trabajos sobre cereales menos frecuentes en nuestra dieta o en la alimentación humana, como el sorgo, la cebada o el centeno.

Estos artículos concluyen que los cereales poseen una significativa capacidad de captación de radicales libres y podrían ser una fuente potencial de antioxidantes naturales. Los principales responsables de esta capacidad antioxidante serían compuestos fenólicos, en concreto, ácidos fenólicos, como el ácido ferúlico y el cafeico en sus formas libres y esterificadas, distintos flavonoides, avenantramidas (conjugados de ácidos hidroxicinámicos sustituidos presentes en la avena) y  $\gamma$ -oryzanol (una mezcla de 10 ésteres ferúlicos de alcoholes triterpénicos presentes en el salvado de trigo) (Peterson, 2001; Peterson et al., 2002; Xu, 2001; Yu et al., 2004; Nacz & Shahidi, 2006).

Sin embargo, en la mayoría de los trabajos sobre la capacidad antioxidante de los cereales el procedimiento utilizado para extraer los antioxidantes puede ser



incompleto. En la mayoría de estos experimentos, el disolvente más habitual es el etanol absoluto (Yu et al., 2002b; Yu et al., 2002c) o mezclas de etanol: agua en diferentes proporciones (Gray et al., 2002; Yu et al., 2002a; Adom, Sorrells & Liu 2003; Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005; Nam et al., 2005), a pesar de que la extracción de compuestos fenólicos se podría mejorar empleando disolventes más polares como el metanol (Zielinski, 2000). Aunque algunos autores usan metanol: agua como disolvente de extracción (Handelman et al., 1999), no es frecuente que lo empleen acidificado, algo que también puede mejorar la eficacia de la extracción (Awika, Rooney & Waniska, 2005; Iqbal, Bhanger & Anwar 2007)

Así mismo, en general se usa un solo ciclo de extracción. Sin embargo, se ha reportado que, aunque el primer ciclo de extracción arrastra un 87% de polifenoles, al segundo todavía pasan el 8% (Mukhopadhyay, Luthria & Robbins, 2006).

El objetivo de este trabajo era determinar la capacidad antioxidante de cereales y productos derivados de consumo frecuente a partir de una extracción de compuestos polifenólicos efectuada en dos fases, empleando una primera mezcla de disolventes con un carácter polar y acidificada (metanol/agua 50:50 v/v pH=2) seguida de una mezcla con un carácter más apolar (acetona/agua 70:30 v/v). Así mismo, con posterioridad se efectuó una hidrólisis ácida en el residuo de esta extracción para determinar los taninos hidrolizables presentes en el mismo y la capacidad antioxidante asociada a los mismos, así como una hidrólisis con butanol acidificado para medir taninos condensados y su capacidad antioxidante. Estos compuestos fenólicos presentes en el residuo de la extracción son habitualmente ignorados en los trabajos sobre capacidad antioxidante de alimentos, a pesar de que pueden ser una fuente importante de capacidad antioxidante.

Las muestras seleccionadas para este trabajo fueron arroz crudo y hervido, harina de trigo, pan, salvado de trigo y salvado de avena. La harina de trigo y el arroz son las principales fuentes de cereales en la dieta, mientras que los salvados de trigo y avena están teniendo un uso creciente en cereales para desayuno y en productos enriquecidos con fibra. El arroz hervido y el pan (cuyo ingrediente principal es la harina de trigo, junto con agua, sal y algunos aditivos) son dos de las formas más habituales de consumir cereales y en ambos alimentos ha tenido lugar un proceso de calentamiento, por lo que se pensó que estas muestras permitirían realizar también una aproximación al efecto del calor en la capacidad antioxidante de cereales.

Para determinar la capacidad antioxidante de estas muestras, se emplearon dos métodos complementarios: el FRAP, que mide la capacidad de reducción de Fe de la muestra, y el DPPH, que determina la capacidad de captación de radicales libres.

### **3.1.1 Polifenoles y capacidad antioxidante asociada a los sobrenadantes**

Previamente, se hizo un ensayo para comparar los disolventes más habitualmente empleados en la bibliografía para extraer antioxidantes de los cereales (etanol/ agua 70:30 v/v, acetona/agua 50:50 v/v y metanol/agua 50:50 v/v), y aquellos empleados rutinariamente en nuestro laboratorio para extraer polifenoles de alimentos vegetales, que son metanol ácido/agua (50:50 v/v, pH 2), seguido de acetona/agua (70:30, v/v). Este ensayo se aplicó a dos de las muestras, la harina de trigo y el salvado de trigo. El mayor contenido en polifenoles determinado por el método de Folin-Ciocalteu se obtuvo mediante el empleo sucesivo de metanol ácido/agua (50:50 v/v, pH 2) y acetona/agua (70:30, v/v), como se puede ver en la **Tabla 3**. Por ejemplo, en el caso de la harina de trigo, estos disolventes proporcionaron más del doble que la mezcla etanol/agua 70:30 v/v y casi el triple que la de metanol/agua 70:30 v/v.

**Tabla 3.** Polifenoles extraíbles de harina y salvado de trigo empleando distintos disolventes de extracción.

Disolvente	polifenoles extraíbles harina de trigo*	polifenoles extraíbles salvado de trigo*
Metanol/agua 50:50 v/v pH=2	3440 $\pm$ 330	2740 $\pm$ 31
seguido de acetona:agua 70:30 v/v		
Metanol/agua 50:50 v/v pH=2	1680 $\pm$ 260	1640 $\pm$ 70
Acetona/agua 70:30 v/v	1154 $\pm$ 78	2160 $\pm$ 90
Acetona/agua 50:50 v/v	2960 $\pm$ 80	2370 $\pm$ 40
Etanol/agua 70:30 v/v	1640 $\pm$ 50	2420 $\pm$ 40
Metanol/agua 70:30 v/v	1280 $\pm$ 30	1860 $\pm$ 60

\* mg equivalentes ácido gálico/kg

Habiendo, por tanto, seleccionado estos disolventes como los más adecuados para la extracción de compuestos fenólicos, se procedió a aplicarlos al conjunto de muestras. En la **Tabla 4** se muestran los polifenoles totales determinados en los sobrenadantes de esta extracción acuoso-orgánica, así como la capacidad antioxidante asociada a los mismos, determinada por los métodos FRAP y DPPH.

**Tabla 4.** Contenido en polifenoles extraíbles y capacidad antioxidante asociada en extracciones acuoso-orgánicas de cereales y derivados (metanol/agua acidificado 50:50 v/v, pH =2 seguido de acetona/agua70:30 v/v)

Muestra	polifenoles extraíbles	FRAP	DPPH		
	(mg ácido gálico/ g ms)	( $\mu$ mol Trolox/ g ms)	EC (g/g)	t <sub>EC50</sub> (min)	AE
Arroz crudo	1340 $\pm$ 20	1,57 $\pm$ 0,14	520,45 $\pm$ 35,71	21,39 $\pm$ 1,59	0,0001
Arroz hervido	210 $\pm$ 20	1,07 $\pm$ 0,07	272,26 $\pm$ 34,24	29,77 $\pm$ 3,18	0,0001
Harina trigo	3440 $\pm$ 330	1,63 $\pm$ 0,13	726,01 $\pm$ 30	9,37 $\pm$ 1,22	0,0001
Pan	760 $\pm$ 20	2,86 $\pm$ 0,23	105,9 $\pm$ 2,82	50,09 $\pm$ 0,1	0,0002
Salvado avena	1950 $\pm$ 80	3,68 $\pm$ 0,14	246,47 $\pm$ 11,86	22,07 $\pm$ 1,08	0,0002
Salvado trigo	2800 $\pm$ 40	4,41 $\pm$ 0,10	314,36 $\pm$ 15,56	24,59 $\pm$ 2,53	0,0001

En primer lugar, por lo que se refiere al contenido relativo en polifenoles de las muestras analizadas, las muestras que presentan un mayor contenido son la harina de trigo, el salvado de trigo y el salvado de avena. Respecto a los polifenoles determinados en los productos tratados con calor, en el caso del pan los polifenoles extraíbles se redujeron, en un 78,04%, respecto a la harina. Esto parece ser una consecuencia del efecto de las altas temperaturas (250°C) alcanzadas durante su elaboración. Análogamente, en el arroz hervido se produce una significativa reducción en compuestos fenólicos respecto del crudo, de un 84,16%.

Como se ha indicado previamente, el modo de extracción utilizado en este ensayo fue considerablemente diferente al empleado en la bibliografía, al acidificar la mezcla metanol/agua y al utilizar dos extracciones sucesivas de metanol/agua y acetona/agua. Al comparar estos resultados con los obtenidos en la bibliografía con otros solventes, se observó que los obtenidos por este procedimiento eran notablemente superiores. Por ejemplo, Yu, tras aplicar una extracción con etanol (Yu et al., 2002b; Yu et al., 2002c) obtuvo contenidos en polifenoles entre 360 y 920 mg ácido gálico/kg ms para el salvado de trigo y de 260 mg/kg para el salvado de avena. Zhou et al. (2004b), al aplicar metanol acuoso, obtuvo unos valores mucho mayores; en concreto, 1100 mg/kg de polifenoles extraíbles para el salvado de trigo y 2600 mg/kg para el salvado de avena, mostrando cómo, efectivamente, la extracción de polifenoles con metanol acuoso resulta más efectiva que la de etanol. En nuestro caso, el resultado fue de 2800 mg ácido gálico/kg ms para el salvado de trigo y 1900 mg/kg para el salvado de avena. Por tanto, la extracción en una sola etapa con etanol o con metanol/agua de polifenoles de cereales o productos derivados, resultaría mucho más incompleta que la aplicación sucesiva de metanol/ agua acidificado (50:50 v/v, pH =2) y acetona/agua (70:30, v/v)

Se debe señalar que estos resultados concuerdan con ensayos realizados con otros autores, en los que se ha observado que la capacidad de extracción de polifenoles aumenta al añadir agua a un disolvente orgánico hasta un cierto nivel, en el que se alcanza el máximo de extracción (Mukhopadhyay, Luthria & Robbins, 2006). En cualquier caso, las condiciones idóneas de extracción para una muestra pueden diferir de las de otra, por lo que, aunque rutinariamente se use un cierto protocolo de extracción previamente optimizado, cada muestra siempre tendrá su protocolo adecuado.

Otro factor que podría explicar la diferencia entre los valores obtenidos en este trabajo y los descritos en la literatura puede tener que ver con el tamaño de partícula. En general, los trabajos publicados sobre capacidad antioxidante de cereales no describen el tamaño de partícula al que se molió la muestra. Sin embargo, éste puede ser un factor crítico en la liberación de polifenoles y la posterior determinación de capacidad antioxidante, ya que el área superficial por unidad de masa aumenta cuando se reduce el tamaño de partícula, y esto afecta a la solubilidad, ya que facilita la salida de la matriz al disolvente de los compuestos antioxidantes, al haber un número mayor de poros por los que salir para cada compuesto (Mukhopadhyay, Luthria & Robbins, 2006)

Por otro lado, respecto al contenido en polifenoles de estas muestras, resulta interesante señalar que, al tratar con el contenido en antioxidante de un alimento o grupo de alimentos, estos no se deben analizar de forma individual, sino como constituyentes de una dieta global. En ese sentido, un reciente trabajo en el que se analizó el contenido en polifenoles de la dieta española determinó que, a pesar de que los cereales tienen un contenido en polifenoles inferior al de otros grupos de alimentos, como las frutas y las verduras, su elevada ingesta en nuestro país (característica de la dieta mediterránea), hace que sean el grupo de alimentos de origen vegetal que aportan una mayor cantidad de polifenoles a la dieta (Saura-Calixto, Serrano & Goñi, 2007)

La **Tabla 4** también muestra los resultados de capacidad antioxidante determinada en estas extracciones, mediante los métodos FRAP y DPPH. En el método FRAP, los salvados de trigo y avena son las muestras con mayor capacidad antioxidante. En este sentido, en un reciente estudio prospectivo sobre 42.850 varones, se encontró una asociación significativa entre la ingesta de salvado y una reducción en el riesgo de enfermedad coronaria (Kensen, 2004). La contribución relativa de los antioxidantes del salvado, la fibra dietética y otros constituyentes a este efecto beneficioso todavía tiene que ser elucidada.

Por otro lado, en el ensayo FRAP los salvados también presentan una capacidad antioxidante superior a la de la harina de trigo, lo que se contradice con los contenidos en polifenoles extraíbles que aparecen en la misma tabla. Esto puede estar relacionado con el hecho de que, como se ha comentado en la introducción de esta memoria, hay una gran cantidad de sustancias no fenólicas que pueden interferir en la reacción de Folin, afectando a los valores de contenido en polifenoles. Entre estas

sustancias se encuentran algunos aminoácidos, el ácido fítico, azúcares, proteínas, sustancias inorgánicas, etc. (Baublis, 2000; Midorikawa, 2001; Yu et al., 2004; Prior, 2005)

Es interesante señalar que a pesar de la reducción en el contenido en polifenoles en el pan respecto de la harina, su capacidad antioxidante es superior. Esto podría deberse a la formación de compuestos de Maillard durante el proceso de elaboración del pan (Ramirez-Jimenez, 2000) Se ha descrito la capacidad antioxidante de algunos de estos compuestos (Morales, 2002), especialmente cuando el aminoácido que reacciona con el azúcar es histidina o cisteína. En concreto, recientemente se ha descrito la capacidad antioxidante de los compuestos de Maillard en el pan (Borrelli, 2003).

Así mismo, a pesar de la gran reducción en el contenido en polifenoles, sólo hay diferencias menores en la capacidad antioxidante del arroz hervido respecto del crudo. Esto sugiere una liberación de antioxidantes no fenólicos de la matriz del alimento durante el hervido.

Por otro lado, a partir de estos resultados se puede ver que existe una considerable correlación ( $R^2 = 0,7919$ ) entre los polifenoles extraíbles y la capacidad antioxidante determinada por el método FRAP, aunque no llega a ser significativa ( $p = 0,066$ ). En cualquier caso, esta tendencia podría indicar que los polifenoles son uno de los principales antioxidantes de la dieta.

Finalmente, en la **Tabla 4** también se muestra la capacidad de captación por parte de los antioxidantes presentes en estas muestras del radical libre DPPH. Los valores de  $EC_{50}$  proporcionan el siguiente orden de capacidad antioxidante: pan > salvado de avena > arroz hervido > salvado de trigo > arroz crudo > harina de trigo. La primera posición del pan podría deberse a que los compuestos de Maillard fueran más susceptibles a esta reacción que a la que tiene lugar en el FRAP. Lo mismo ocurriría con los antioxidantes no fenólicos del arroz liberados durante la cocción, lo que explicaría la mayor capacidad antioxidante del arroz hervido frente al salvado de trigo, a diferencia del FRAP; por otro lado, el arroz hervido presenta de nuevo mayor capacidad antioxidante que el crudo. Finalmente, los resultados obtenidos concuerdan con los del FRAP en el sentido de que los salvados presentan mayor capacidad antioxidante que la harina de trigo, lo que confirmaría que el contenido en polifenoles

extraíbles de la harina de trigo determinado por Folin es un valor anómalo debido a las interferencias ya explicadas presentes en este método.

Respecto a la cinética, los resultados del DPPH\* indican que los antioxidantes de la harina de trigo tienen la cinética más rápida (menor  $t_{EC50}$ , necesitan menos tiempo para llegar a reducir en un 50% la cantidad inicial de radical, teniendo la concentración adecuada de antioxidante), mientras que la más lenta corresponde al pan en la extracción acuoso-orgánica y al salvado de avena en la extracción con enzimas digestivas, seguida del pan. Estos resultados sugieren que los compuestos de Maillard actúan como antioxidantes más lentamente que los compuestos fenólicos, lo que resulta en un mayor  $t_{EC50}$ . En cualquier caso, habría que considerar el hecho de que el pan fue adquirido en el supermercado y se desconoce qué tipo y cantidad de harina se emplearon en su elaboración, lo que podría explicar parcialmente las diferencias entre ambas muestras, junto con la posible presencia de antioxidantes artificiales.

El resto de las muestras presentaron valores intermedios de  $t_{EC50}$

Por otro lado, muchos de los trabajos publicados han presentado a los cereales como una fuente importante de capacidad antioxidante. Sin embargo, es necesario considerar, no sólo los valores absolutos de capacidad antioxidante, sino compararlos con los de otros alimentos de origen vegetal. En este sentido, la primera observación empírica que se hizo fue que era necesario tomar más muestra de la necesitada habitualmente en nuestro laboratorio para determinar el contenido en polifenoles y la capacidad antioxidante de otros productos vegetales mediante los mismos análisis, lo que indica que los cereales tienen menos capacidad antioxidante que otros alimentos de origen vegetal, como ciertas frutas, verduras y bebidas. Además, no fue posible aplicar el ABTS, un problema descrito previamente por Yu et al. (2004). Esto podría estar relacionado precisamente con la escasa capacidad antioxidante de los cereales en comparación con otros alimentos vegetales, en los que se suele aplicar este método y para los que, por tanto, se encontrarían optimizadas sus condiciones.

Para confirmar esto, se compararon los valores obtenidos de capacidad antioxidante de cereales con los obtenidos para otras muestras en la bibliografía. Así, Guo (2003) determinó por FRAP la capacidad antioxidante de diferentes frutas. Estos valores indican que los cereales son unas cinco veces menos antioxidantes que la naranja o el limón y unas diez veces menos que la fresa. Resultados similares se

pueden observar comparando los cereales con bebidas (Pulido, 2003) Así mismo, en lo que se refiere al DPPH•, la capacidad antioxidante de estas muestras es escasa, mostrando no solo una elevada  $EC_{50}$ , sino también un alto  $t_{EC50}$ , lo que resulta en una baja eficiencia antirradicálica.

Sin embargo, y, como se ha explicado previamente, la ingesta de cereales en nuestro país (221,65 g por persona y día) es superior a la de otros grupos de alimentos vegetales con mayor capacidad antioxidante, como pueden ser las frutas (200,6 g por persona y día) o los frutos secos (5,96 g por persona y día). Esto hace que, al analizar la capacidad antioxidante de la dieta española tras llevar a cabo una extracción con enzimas digestivas como la descrita en este trabajo, nuestro grupo encontrara que los cereales, junto con la bebida, son los principales responsables de la capacidad antioxidante de la dieta española (Serrano, Goñi & Saura-Calixto, 2007)

### **3.1.2 Polifenoles y capacidad antioxidante asociada a los residuos**

Sin embargo, los antioxidantes extraíbles son sólo una parte del conjunto de antioxidantes presentes en un alimento vegetal. También se determinaron compuestos antioxidantes (taninos hidrolizables y taninos condensados) en el residuo de las extracciones.

Los taninos condensados se midieron en todas las muestras, sin obtener resultados. Esto concuerda con un estudio previo, que concluyó que ni los salvados ni el arroz contienen taninos condensados (Miller et al., 2003)

La **Tabla 5** muestra el contenido en taninos hidrolizables, así como la capacidad antioxidante asociada a los mismos, determinada por el método FRAP en las muestras de cereales y productos derivados. El método DPPH no se pudo aplicar por la aparición de un precipitado.



**Tabla 5.** Contenido en taninos hidrolizables y capacidad antioxidante asociada en los residuos de las extracciones acuoso-orgánicas de cereales y derivados (metanol/agua acidificado 50:50 v/v, pH =2 seguido de acetona/agua70: 30 v/v)

Muestra	polifenoles extraíbles (mg ácido gálico/kg ms)	FRAP ( $\mu$ mol Trolox/g ms)
Arroz crudo	3870 $\pm$ 250	17,64 $\pm$ 2,73
Arroz hervido	3490 $\pm$ 202	5,09 $\pm$ 0,77
Harina de trigo	2510 $\pm$ 47	8,92 $\pm$ 0,47
Pan	4400 $\pm$ 190	6,81 $\pm$ 0,45
Salvado de avena	9710 $\pm$ 890	30,59 $\pm$ 1,71
Salvado de trigo	16430 $\pm$ 1500	108,30 $\pm$ 0,46

En primer lugar, hay que señalar que en el residuo de la extracción acuoso-orgánica hay una cantidad significativa de estos compuestos (entre 2.510 y 16.430 mg ácido gálico/kg ms). De hecho, los salvados son más ricos en taninos hidrolizables que en polifenoles extraíbles. Es importante indicar que los polifenoles no extraíbles se ignoran habitualmente en la evaluación de la capacidad antioxidante de cereales y de otros alimentos.

En cuanto al orden relativo de contenido en taninos hidrolizables, al igual que ocurría con los polifenoles extraíbles, los salvados, seguidos del pan, son las muestras más ricas en antioxidantes.

En la **Tabla 5** también aparecen los resultados de capacidad antioxidante (método FRAP). Se puede ver que los taninos hidrolizables presentan mayor capacidad de reducción de Fe que los polifenoles extraíbles (**Tabla 4**). Previamente, ya se había descrito (Pulido, 2000) que los ácidos fenólicos como el ácido gálico presentan mayor capacidad antioxidante determinada por el método FRAP que los flavonoides, como las catequinas, presentes, junto con otros compuestos, en la fracción de los polifenoles extraíbles. Es decir, que estos compuestos que son ignorados en muchas muestras, como ya se ha indicado, presentan de hecho más capacidad antioxidante que los polifenoles extraíbles, que son los que se analizan de manera más habitual y, en el caso de los cereales, contribuyen de una manera más importante a la capacidad antioxidante global de las muestras.

Aunque la mayoría de estos compuestos no serían accesibles en el intestino delgado, sí pueden alcanzar el colon, donde podrían ser fermentados, proporcionando un medio ambiente antioxidante en el tramo final del tracto digestivo (Saura-Calixto et al., 2006)

*En resumen,*

- *La capacidad antioxidante de los cereales puede estar subestimada en la bibliografía porque los disolventes de extracción habitualmente usados no permiten una liberación completa de compuestos antioxidantes.*
- *Es necesaria la combinación de al menos dos mezclas de extracción con diferente polaridad para conseguir una extracción óptima de antioxidantes en cereales.*
- *La capacidad antioxidante asociada a los residuos de extracciones acuosas-orgánicas es muchas veces ignorada, a pesar de que su contribución a la capacidad antioxidante total de la muestra puede ser muy apreciable.*

### **3.2 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ASOCIADA A UNA EXTRACCIÓN FISIOLÓGICA *IN VITRO***

En el capítulo anterior, se ha propuesto un procedimiento de extracción de polifenoles en cereales que puede resultar más efectivo que los empleados habitualmente en este tipo de muestras. Sin embargo, estas capacidades antioxidantes determinadas en extractos acuoso-orgánicos podrían diferir cuantitativa y cualitativamente respecto de las que serían obtenidos en condiciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal humano. Baublis et al. (2000) intentó hacer una aproximación a las condiciones fisiológicas en la determinación de la capacidad antioxidante de cereales, pero sólo en las condiciones de acidez y no usó ningún tratamiento enzimático.

En este sentido, se planteó como objetivo llevar a cabo una determinación de la capacidad antioxidante de distintos cereales, como materias primas y en forma de alimentos procesados, utilizando una extracción *in vitro* con enzimas digestivas, que emularía, en lo posible, las condiciones presentes en el tracto gastrointestinal humano (enzimas empleadas, pH, temperatura, tiempo de incubación). En concreto, las enzimas digestivas a emplear sería, sucesivamente, pepsina, pancreatina,  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa. Las condiciones concretas de cada uno de estos tratamientos enzimáticos han sido descritas previamente en el apartado Materiales y Métodos.

Mediante este tratamiento se podría determinar la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes y de su capacidad antioxidante asociada presentes en una muestra, es decir, si a lo largo del proceso de digestión serían liberados, de manera que pudieran estar en condiciones de ser absorbidos. Para conocer cuál es el porcentaje de esta capacidad antioxidante que realmente es absorbido y, por tanto, estar en condiciones de acceder a los tejidos, esta metodología se debería completar con estudios de biodisponibilidad. En cualquier caso, supone una primera aproximación más fisiológica que las usadas tradicionalmente al efecto que puede tener una muestra rica en compuestos antioxidantes en el organismo. Por otro lado, no hay que olvidar que, incluso aunque una gran parte de estos compuestos no fueran absorbidos, podrían ejercer su capacidad antioxidante a lo largo del tracto digestivo y, particularmente, en el colon, donde serían susceptibles de ser fermentados por las microflora colónica.

### 3.2.1 Polifenoles y capacidad antioxidante asociada a los sobrenadantes

En la **Tabla 6** aparecen los valores de polifenoles extraíbles y capacidad antioxidante asociada (métodos FRAP y DPPH determinados en los sobrenadantes de las extracciones con enzimas digestivas)

**Tabla 6.** Contenido en polifenoles extraíbles y capacidad antioxidante asociada en el sobrenadante de extracciones con enzimas digestivas de cereales y derivados (tratamientos con pepsina, pancreatina, amilasa y amiloglucosidasa)

Muestra	polifenoles extraíbles	FRAP	DPPH		
	(mg ácido gálico/ kg ms)	( $\mu$ mol Trolox/ g ms)	EC (g/g)	t <sub>EC50</sub> (min)	AE
Arroz crudo	6470 $\pm$ 70	3,77 $\pm$ 0,45	161,10 $\pm$ 4,83	2,09 $\pm$ 0,76	0,003
Arroz hervido	3230 $\pm$ 60	4,30 $\pm$ 0,35	58,93 $\pm$ 4,67	4,67 $\pm$ 0,70	0,0036
Harina de trigo	7030 $\pm$ 200	5,62 $\pm$ 0,69	151,59 $\pm$ 3,37	1,14 $\pm$ 0,05	0,0058
Pan	3540 $\pm$ 110	6,59 $\pm$ 0,88	74,05 $\pm$ 0,84	8,13 $\pm$ 0,91	0,0017
Salvado de avena	8450 $\pm$ 260	11,81 $\pm$ 1,90	145,55 $\pm$ 8,62	5,8 $\pm$ 1,28	0,0012
Salvado de trigo	8630 $\pm$ 250	22,73 $\pm$ 1,34	89,47 $\pm$ 2,5	11,69 $\pm$ 0,32	0,0010

Por lo que se refiere al contenido en polifenoles, la muestra más rica es el salvado de trigo, seguido del salvado de avena y la harina de trigo. Este orden significa una pequeña diferencia con el obtenido en la extracción acuoso-orgánica previamente comentada (**Tabla 4**) y tiene que ver con los distintos mecanismos de ruptura de estructuras y liberación de compuestos que actúan en cada una de las dos extracciones analizadas.

Pero lo más destacable es que la cantidad de polifenoles determinada tras una extracción con enzimas digestivas es, en todas las muestras analizadas, significativamente superior a la de los extractos acuoso-orgánicos. Esto sugiere que la cantidad de antioxidantes liberada por la matriz de los cereales en el intestino humano y, por tanto, la capacidad antioxidante de estas muestras, puede ser superior a la que se esperaría de los datos obtenidos a partir de extracciones acuoso-orgánicas. Este hecho se debería considerar al evaluar la capacidad antioxidante de los cereales desde un punto de vista nutricional. Como ya se ha indicado, estos antioxidantes serían potencialmente biodisponibles en el intestino delgado y ejercerían su acción en

los tejidos en función del grado de absorción que presentaran, además del posible efecto beneficioso que podrían tener en el colon.

Respecto a la naturaleza química de este mayor número de polifenoles liberados tras la extracción con enzimas digestivas, aunque el objetivo de este trabajo no era caracterizar los polifenoles presentes en los cereales, sino estudiar de manera global los antioxidantes presentes en los mismos y su capacidad antioxidante asociada, cabe destacar que una elevada proporción de los polifenoles mayoritarios en los cereales, como son los ácidos fenólicos, se encuentra esterificada a otros compuestos (Naczk & Shahidi, 2006). Otros trabajos han mostrado cómo el tratamiento con enzimas, como  $\alpha$ -amilasa, o su combinación con celulosa, han permitido la liberación de ácidos fenólicos esterificados del centeno (Zupfer et al., 1998), por lo que se podría pensar que la cantidad mayor de polifenoles obtenida tras la extracción con enzimas digestivas se debe a la liberación de estos compuestos. Por otro lado, esto podría explicar el distinto orden obtenido en el contenido en polifenoles de las distintas muestras según la extracción empleada, que ya se comentó anteriormente; si en la harina de trigo, obtenida a partir del endospermo, la extracción con enzimas digestivas proporciona valores de polifenoles del doble que la extracción acuoso-orgánica, en los salvados de trigo y avena, que incluyen la capa de aleurona, rica en ácidos fenólicos esterificados a arabinoxilanos y arabinogalactanos (Cliford, 1999), el contenido en polifenoles se multiplica por tres y por cuatro, respectivamente, en la extracción con enzimas digestivas respecto de la extracción acuoso-orgánica.

A su vez, este mayor contenido en compuestos fenólicos en las extracciones con enzimas digestivas frente a las acuoso-orgánicas, concuerda con una mayor capacidad antioxidante asociada a estos extractos, tanto por el método FRAP como por el DPPH. De hecho, los órdenes de contenido en polifenoles y capacidad antioxidante (método FRAP) se mantienen –exceptuando el valor anómalo ya mencionado de la harina de trigo.

Sin embargo, al hallar la correlación entre el contenido en polifenoles y la capacidad antioxidante por el método FRAP en estos extractos no se halló una relación significativa ( $p = 0,158$ ), y la  $R^2$  resultó ser de 0,42, mientras que en los sobrenadantes de la extracción acuoso-orgánica la  $R^2$  era bastante mayor. Esto podría estar relacionado con una mayor proporción de interferencias en el método Folin tras el tratamiento con enzimas digestivas, al haberse liberado aminoácidos y azúcares que pueden dar falsos positivos en este método. Por tanto, en estos sobrenadantes

resultarían más veraces los valores de capacidad antioxidante que los de contenido en polifenoles.

Respecto a los valores del DPPH, el orden de capacidad antioxidante es arroz hervido > pan > salvado de trigo > salvado de avena > harina de trigo > arroz crudo. Se mantienen las tendencias generales respecto a la capacidad antioxidante de las diferentes muestras, aunque hay ciertas variaciones debido a los diferentes mecanismos de extracción empleados.

Respecto al parámetro AE, cuyo significado ha sido explicado previamente, puede verse cómo por ejemplo, aunque el arroz crudo y la harina de trigo tienen un  $EC_{50}$  similar, al ser el  $t_{EC_{50}}$  de la harina de trigo la mitad que el del arroz crudo, esto resulta en una AE de la harina de trigo que es el doble que la del arroz crudo. Así mismo, en el caso del arroz crudo y el arroz hervido aunque el primero tiene una mayor  $EC_{50}$  y, por tanto, una menor capacidad antioxidante, también presenta una cinética más rápida, lo que hace que al final ambas muestras presenten una AE similar.

Si se comparan los valores de DPPH en la extracción acuoso-orgánica y la extracción con enzimas digestivas, se puede observar no sólo una reducción de la  $EC_{50}$  en la segunda, lo que implica más capacidad antioxidante, sino que también el  $t_{EC_{50}}$  es menor, redundando ambos factores en un aumento de la capacidad antioxidante.

Por tanto, en los dos métodos aplicados para medir capacidad antioxidante se observa una mayor capacidad cuando las muestras se someten a extracciones con enzimas digestivas que cuando se someten a una extracción acuoso-orgánica. En este sentido, es interesante destacar que nuestro grupo ha aplicado esta misma metodología de extracción con enzimas digestivas a una dieta de manera global, observando de nuevo cómo las extracciones químicas habitualmente efectuadas pueden llevar a una subestimación de la capacidad antioxidante (Serrano, Goñi & Saura-Calixto, 2007). Igualmente, otro trabajo efectuó un tratamiento enzimático en distintos cereales, observando también una liberación de compuestos polifenólicos y, por tanto, de capacidad antioxidante (Napolitano et al., 2006)

### 3.2.2 Polifenoles y capacidad antioxidante asociada a los residuos

En la **Tabla 7** aparecen los contenidos en taninos hidrolizables y la capacidad antioxidante asociada por el método FRAP determinados en los residuos de la extracción con enzimas digestivas.

**Tabla 7.** Contenido en taninos hidrolizables y capacidad antioxidante asociada en los residuos de las extracciones con enzimas digestivas de cereales y derivados (tratamientos con pepsina, pancreatina, amilasa y amiloglucosidasa)

Muestra	polifenoles extraíbles (mg ácido gálico/g ms)	FRAP ( $\mu$ mol Trolox/g ms)
Arroz crudo	1243 $\pm$ 6	1,64 $\pm$ 0,05
Arroz hervido	1642 $\pm$ 4	2,07 $\pm$ 0,26
Harina de trigo	1019 $\pm$ 54	2,71 $\pm$ 0,18
Pan	1548 $\pm$ 165	4,78 $\pm$ 0,83
Salvado de avena	4336 $\pm$ 188	13,22 $\pm$ 0,98
Salvado de trigo	9662 $\pm$ 222	47,66 $\pm$ 0,47

De nuevo, los salvados presentan un mayor contenido en compuestos antioxidantes que el resto de las muestras, mostrando, una vez más, el mayor aporte de compuestos biactivos de estos productos frente a los cereales refinados.

Por otro lado, se observa una clara reducción en el contenido en taninos hidrolizables en la extracción con enzimas digestivas respecto de la acuoso-orgánica. Al comparar la suma de los polifenoles en los extractos acuoso-orgánicos (polifenoles extraíbles) y en sus residuos (taninos hidrolizables) (**Tablas 4 y 5**) con la suma de polifenoles en las extracciones con enzimas digestivas y en sus residuos (**Tablas 6 y 7**), se obtuvieron valores del mismo orden en alguna de las muestras, mientras que, en otras, la suma de los valores obtenidos eran superiores en la extracción con enzimas digestivas. Esto implicaría que, por un lado, la extracción con enzimas digestivas hidrolizaría parte de los taninos hidrolizables presentes en la muestra y, al mismo tiempo, liberaría otros compuestos polifenólicos no liberados por la extracción química, ni tras la extracción directa sobre la muestra ni tras el tratamiento efectuado en el residuo. Por tanto, la liberación de compuestos antioxidantes en el tracto

gastrointestinal puede ser no sólo cuantitativa, sino también cualitativamente diferente a la que se produce en una extracción química.

Finalmente, en consonancia con la reducción de taninos hidrolizables en el residuo de la extracción con enzimas digestivas respecto de la química, se observa un descenso en la capacidad antioxidante en los residuos de la extracción con enzimas digestivas. Una vez más, los salvados y en particular el salvado de trigo, con una capacidad antioxidante de  $47,66 \pm 0,47$ , son las muestras que proporcionan valores más elevados.

*En resumen,*

- *La capacidad antioxidante asociada a los sobrenadantes y a los residuos de una extracción de cereales con enzimas digestivas es superior a la obtenida tras una extracción acuoso-orgánica.*

- *Este procedimiento de extracción podría tener mayor relevancia nutricional que las extracciones acuoso-orgánicas habitualmente empleadas.*

- *Entre las muestras de cereales analizadas, los salvados, y en particular el de trigo, fueron los que proporcionaron una mayor capacidad antioxidante.*



### **3.3 EFECTO DEL DISOLVENTE Y DE CIERTOS CONSTITUYENTES DE LOS ALIMENTOS EN LA DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Existen una gran cantidad de métodos disponibles para determinar capacidad antioxidante *in vitro*, basados en los diferentes modos a través de los cuales los antioxidantes pueden ejercer su acción, distintos medios, etc. Entre todos estos métodos, los más utilizados durante los últimos años son el FRAP, el ABTS, el DPPH y el ORAC.

De ellos, el FRAP es el único método que no se basa en la captación de radicales libres, sino en la capacidad de reducción de compuestos metálicos, que en el organismo pueden actuar como prooxidantes. En este método, en un medio ácido, el complejo hierro-tripiridiltriazina se reduce a su forma ferrosa y coloreada en presencia de un antioxidante, produciendo un aumento en la absorbancia a 595 nm. La absorbancia determinada tras un cierto periodo de tiempo se interpola en una curva de calibrado de Trolox, y los resultados se expresan como equivalentes Trolox.

El método ORAC, por su parte, se basa en la capacidad de captación del radical peroxilo, uno de los ROS generados *in vivo*, aunque es necesario señalar que el fundamento del método no tiene que ver con ninguna reacción fisiológica. En concreto, el ensayo se basa en la generación del radical en presencia de calor a partir de la molécula AAPH (2, 2'-azobis (2-amidinopropano)dihidrocloruro) y en el ataque posterior de este radical a una molécula fluorescente, la fluoresceína, generando un descenso en la intensidad de su emisión, que es monitorizado. El área bajo la curva generada en presencia del antioxidante, frente a la generada al probar un blanco, es interpolada en una curva de calibrado de Trolox, expresando los resultados en equivalentes Trolox. La medida obtenida, por tanto, contempla de manera conjunta el grado de inhibición de la fluorescencia ejercido por el antioxidante, así como el tiempo necesario para conseguirlo. Inicialmente, el método se llevaba a cabo en un sistema COBAS FARA II, aunque después fue sustituido por sistemas de placas con 96 pocillos (Huang et al., 2002a)

El método DPPH• (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 2005) es el único de los enumerados en el que los resultados no se expresan en equivalentes Trolox. Está basado en la capacidad de captura por parte de los antioxidantes del radical DPPH•, lo que produce un descenso en la absorbancia a 515 nm. Como se ha explicado en la

sección Materiales y Métodos, este método fue modificado en nuestro laboratorio con el objetivo de introducir parámetros cinéticos (Sánchez-Moreno, Larrauri & Saura-Calixto, 1998). Por otro lado, recientemente se ha publicado otra modificación del mismo, que se basaría en la medida realizada por HPLC, en lugar de espectrofotométricamente (Chandresakar et al., 2006) Este procedimiento permitiría reducir las interferencias asociadas a ciertas muestras pigmentadas, pero proporcionaría una medida puntual y no permitiría estudiar aspectos referentes al comportamiento cinético de los compuestos analizados.

Finalmente, el ABTS se basa en la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical orgánico  $ABTS^{•+}$ , captura que produce un descenso de la absorbancia a 658 nm. Las lecturas de absorbancia de la mezcla de radical y antioxidante a ciertos intervalos durante un tiempo establecido -7 min- se representan gráficamente frente a las de un blanco. A continuación, se calcula el área bajo la curva generada por esta inhibición de la absorbancia y se interpola en una curva de calibrado de Trolox, expresándose los resultados en equivalentes Trolox. El valor obtenido representa, al igual que el del ORAC, el grado de inhibición conseguido por los antioxidantes, así como el tiempo necesario para alcanzarlo, siempre que la inhibición haya alcanzado el 100% en el intervalo establecido. También se han hecho modificaciones en este método basadas en la detección post-columna tras el HPLC (Dapkevicius et al., 2001; Beekwilder et al., 2005) y se han desarrollado sistemas de análisis de inyección secuencial (Pinto et al., 2005; Lima et al., 2006), aunque estos últimos no están disponibles en la mayoría de los laboratorios.

Estos cuatro métodos se emplean rutinariamente en la determinación de capacidad antioxidante de extractos de alimentos obtenidos con diferentes solvente, como el etanol (Yu et al., 2002b), etanol/agua en diferentes proporciones (Gray et al., 2002; Yu et al., 2004), acetona/agua en diferentes proporciones (Ou et al., 2001; Yilmaz & Toledo, 2006), metanol/agua en diferentes proporciones (Yilmaz & Toledo, 2006) o metanol/agua acidificado seguido de acetona/agua (Saura-Calixto & Goñi, 2006). Durante los últimos años, algunos trabajos han señalado la influencia del disolvente de extracción en los valores obtenidos para una misma muestra en el ORAC (Fernández-Pachón et al., 2004; Villano et al., 2004; Yu et al., 2004; Villano et al., 2005), DPPH (Barclay et al., 1999; Valgimigli et al., 1999; Pinelo et al., 2004; Zhou & Yu, 2004b), FRAP (Pulido et al., 2000) y ABTS (Zhou & Yu, 2004b). Esta influencia se debería al hecho de que la transferencia de electrones (SET) y la transferencia de

átomos de hidrógeno (HAT), aspectos clave en la capacidad antioxidante, se ven afectados por el tipo y la polaridad del disolvente.

Sin embargo, ningún trabajo ha abordado sistemáticamente el efecto en la capacidad antioxidante de un extracto de polifenoles determinada por estos cuatro métodos. Así mismo, la presencia en los extractos acuoso-orgánicos habitualmente realizados de compuestos no antioxidantes pero que podrían interferir en los análisis, proporcionando resultados sobreestimados, tampoco ha sido suficientemente considerada. Por tanto, el objetivo de este trabajo era abordar estos dos aspectos.

Para ello, en primer lugar se determinó la capacidad antioxidante de una mezcla de ácido gálico y catequina, como ejemplos de un ácido fenólico y un flavonoide, respectivamente, en agua, metanol/agua (30:70 v/v), metanol/agua (50:50 v/v), metanol/agua acidificado (50:50 v/v pH 2), metanol y acetona/agua (50:50 v/v).

Por otro lado, para determinar el posible efecto en la medida de capacidad antioxidante de compuestos que no presentan esta propiedad, pero que sí podrían estar presentes en las extracciones habitualmente llevadas a cabo, se analizaron mediante FRAP, ABTS, DPPH y ORAC soluciones de los siguientes compuestos: glucosa, pectina y ácido galacturónico como ejemplos de glúcidos; tirosina y triptófano como aminoácidos aromáticos; arginina como aminoácido nitrogenado; cisteína como aminoácido sulfurado; y albúmina como proteína.

Finalmente, se determinó la capacidad antioxidante de soluciones en las que se encontraban presentes tanto los polifenoles anteriormente mencionados disueltos en distintos medios como cada uno de los otros constituyentes de los alimentos, para determinar si el efecto en la capacidad antioxidante de los polifenoles y los otros componentes de los alimentos eran aditivos, o si al mezclarlos aparecían nuevas interacciones.

### **3.3.1 Efecto del disolvente**

La **Tabla 8** muestra los resultados de ORAC, ABTS, FRAP y DPPH para una solución de catequina: ácido gálico 1M: 1M en diferentes solventes. Respecto a los resultados obtenidos para la mezcla en un mismo disolvente en los métodos FRAP, ABTS y ORAC, todos expresados en equivalentes Trolox, se puede ver cómo difieren bastante entre sí. Esto se debe a que, aunque estos tres métodos usen como

estándar el mismo compuesto, están basados, cómo se ha explicado previamente, en reacciones muy diferentes. Esto también ha sido comentado, entre otros autores, por Pellegrini et al. (2003) que, al medir por FRAP, TRAP y ABTS la capacidad antioxidante de una gran cantidad de muestras vegetales, observaron que, en ciertos grupos de alimentos, el orden relativo de capacidad antioxidante variaba considerablemente entre un análisis y otro. Por tanto, al comparar valores de capacidad antioxidante para distintas muestras, se tendría que tomar siempre el mismo método y aplicado en las condiciones lo más parecidas posibles, ya que en la bibliografía existen amplias variantes para un mismo método, que pueden influir significativamente en los resultados.

**Tabla 8.** Resultados de los métodos ORAC, ABTS, FRAP y DPPH en una mezcla de catequina: ácido gálico 1M: 1M en distintos disolventes.

Disolvente	ORAC	ABTS	FRAP	DPPH		
	( $\mu\text{mol Trolox/g}$ )	( $\mu\text{mol trolox/g}$ )	( $\mu\text{mol Trolox/g}$ )	EC <sub>50</sub> (g/g)	t EC <sub>50</sub> (min)	AE
Metanol	20836,6 $\pm$ 2079,6 <sup>a</sup>	11291,4 $\pm$ 837 <sup>a</sup>	9642,4 $\pm$ 977,1 <sup>a</sup>	0,083 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	19,72 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	0,61 <sup>a</sup>
Metanol/agua (50:50 v/v)	18284,6 $\pm$ 1661,5 <sup>a</sup>	11148 $\pm$ 730,3 <sup>a</sup>	11149,7 $\pm$ 565,3 <sup>b</sup>	0,080 $\pm$ 0,002 <sup>b,c</sup>	16,70 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	0,75 <sup>b</sup>
Metanol/agua acidificado (50:50 v/v, pH 2)	19818 $\pm$ 750,4 <sup>a</sup>	6763,9 $\pm$ 65,6 <sup>b</sup>	10934 $\pm$ 135,1 <sup>b</sup>	0,081 $\pm$ 0,002 <sup>b,c</sup>	28,02 $\pm$ 2,35 <sup>c</sup>	0,44 <sup>c</sup>
Metanol/agua (30:70 v/v)	19410,8 $\pm$ 2068,4 <sup>a</sup>	26494,5 $\pm$ 2011,7 <sup>c</sup>	14622,7 $\pm$ 1095,9 <sup>c</sup>	0,076 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	19,57 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	0,67 <sup>a,b</sup>
Agua	13543,6 $\pm$ 298,4 <sup>b</sup>	28104 $\pm$ 275,8 <sup>c</sup>	9559,2 $\pm$ 110,7 <sup>a</sup>	0,067 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	19,73 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>	0,75 <sup>b</sup>
Acetona/agua (50:50 v/v)	30217,5 $\pm$ 2100,1 <sup>c</sup>	13894,8 $\pm$ 240,2 <sup>a</sup>	10100,1 $\pm$ 489,7 <sup>a,b</sup>	0,083 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>	19,44 $\pm$ 0,80 <sup>a,b</sup>	0,62 <sup>a</sup>

Letras diferentes en una misma columna indican la existencia de diferencias significativas.

Por lo que se refiere al efecto del disolvente, se puede ver cómo afecta claramente a estos cuatro ensayos de capacidad antioxidante, aunque no lo hace en todos de la misma manera. El ORAC es el método en el que la influencia del disolvente es mayor: el valor de la mezcla catequina: ácido gálico en agua es un 48% inferior al valor de la misma muestra en acetona/agua (50:50 v/v), y estos dos valores son significativamente diferentes a los obtenidos en los otros disolventes probados. En concreto, parece verse una tendencia según la cual el valor ORAC sería más alto cuanto más apolar fuera el disolvente (en este caso, cuanto menos agua existe en la mezcla metanol/agua). Estos resultados concuerdan con otros trabajos previos

(Fernández-Pachón et al., 2004; Villaño et al., 2005), que describieron una relación entre el contenido en etanol de una muestra y el valor obtenido de ORAC, usando como molécula fluorescente la ficoeritrina. Dado que el mismo efecto se ha observado en este ensayo utilizando la fluoresceína como reactivo, la influencia del disolvente parecería ser intrínseca al método ORAC, independientemente del agente fluorescente usado. Estas observaciones contradicen la idea según la cual los ensayos de capacidad antioxidante basados en reacciones HAT son independientes del disolvente, como ha sido planteado, entre otros, por Prior, Wu & Schaich (2005). De hecho, varios autores han señalado cómo en disolventes polares los enlaces de H pueden inducir cambios dramáticos en la capacidad de los antioxidantes fenólicos para donar átomos de H, reduciéndose, por tanto, su capacidad antioxidante (Pedrielli et al., 2001; Pinelo et al., 2004)

También se observó que la presencia de ácido en el disolvente no parece tener una influencia en el ORAC, dado que no hubo diferencias significativas entre los valores de ORAC en metanol/agua (50:50 v/v) y en metanol/agua acidificados (50:50 v/v pH 2), lo que concuerda con trabajos previos (Ou et al., 2001; Dávalos et al., 2004)

En el caso del ABTS, el solvente también afectó de manera importante a los resultados; el valor de la mezcla de compuestos polifenólicos fue un 40% inferior en metanol/ agua (50:50 v/v) que en agua. En este caso, el valor de ABTS fue mayor cuanto más polar era el disolvente. También se observó una clara influencia del pH, con un resultado un 61% inferior en metanol/agua acidificados (50:50 v/v) que en metanol/agua (50:50 v/v), lo que también coincide con lo observado por otros autores (Labrinea & Georgiou, 2004)

La influencia del disolvente también se pudo ver en el ensayo FRAP, aunque, en general, los valores mostraron menos variaciones entre los distintos disolventes que en el caso del ABTS o el ORAC, salvo en el caso de metanol/agua (30:30 v/v), donde el valor obtenido fue muy superior a todos los demás. Por lo que se refiere a la acidez, como el propio ensayo se desarrolla en un medio ácido (pH 3,6), no hubo diferencias significativas entre el valor obtenido en metanol/agua (50:50 v/v) y el obtenido en el mismo disolvente acidificado.

El DPPH fue el ensayo en el que la influencia del disolvente fue menor; la mayor diferencia en los valores tuvo lugar entre el agua, con un  $EC_{50}$  para la mezcla de polifenoles de 0,067 y la mezcla acetona/agua (50:50 v/v) o el metanol, con valores

de 0,083. La acidez del medio no pareció afectar a este método por lo que se refiere al grado de captura del radical para una concentración determinada, pero sí afectó a la cinética; el metanol/agua acidificados (metanol:agua 50:50 v/v pH 2) proporcionó un  $t_{EC50}$  superior al de ningún otro de los disolventes comparados.

Todas las diferencias observadas entre los distintos disolventes habrían sido aún mayores si la muestra analizada hubiera sido un alimento –una matriz compleja en la que los diferentes constituyentes pueden establecer interacciones entre sí y con el disolvente- en lugar de una mezcla de estándares, como en este trabajo. De hecho, en uno de los trabajos de los creadores del método ORAC (Huang, Ou & Prior, 2005), estos reconocían que, en muestras con poca capacidad antioxidante, la matriz alimentaria podría interferir significativamente en la medida. Por tanto, al comparar valores de capacidad antioxidante, éstas tienen que haber sido determinadas en extractos obtenidos con los mismos solventes; si no, los resultados variarán mucho y una comparación directa no tendría sentido.

Para expresar los resultados del FRAP, ABTS y ORAC en equivalentes Trolox, se elaboraron previamente curvas de calibrado de Trolox para cada uno de los disolventes analizados. Las pendientes, ordenadas en el origen y  $R^2$  de estas curvas aparecen en la **Tabla 9**. En todos los métodos, los valores de  $R^2$  fueron elevados en todos los disolventes analizados, mostrando una buena relación dosis-respuesta. Sin embargo, existen diferencias significativas entre los valores de las pendientes y las ordenadas en el origen para los diferentes disolventes en los tres métodos, especialmente en el caso del ABTS y el ORAC, lo que sugiere que el Trolox, al igual que se había observado antes con la catequina y el ácido gálico, no reacciona de la misma manera con todos los disolventes. Lo que es más, no se repiten ciertas tendencias que se habían observado en la mezcla de catequina y ácido gálico, como el hecho de que los valores de ORAC eran superiores cuanto más apolar era el disolvente. De hecho, el agua, el solvente más polar de los analizados, muestra la pendiente más profunda, indicando todo esto que el disolvente afecta a diferentes compuestos de diferente manera.

Por tanto, se puede concluir que, en cualquier ensayo de capacidad antioxidante, los resultados se deben referir a una curva de calibrado elaborada en el mismo disolvente que se utiliza para la extracción de compuestos antioxidantes en la muestra a analizar, dado que los estándares se pueden comportar de manera diferente en función del medio en que se encuentren.

**Tabla 9.** Pendientes, ordenadas en el origen y  $R^2$  para las curvas de calibrado de Trolox ( $y = ax + b$ ) para el FRAP, ABTS y ORAC en distintos solventes, siendo la  $x$  la concentración de Trolox  $\mu\text{M}$  e  $y$  la absorbancia en el caso del FRAP y el área neta bajo la curva para el ABTS y el ORAC

Disolvente	FRAP			ORAC			ABTS		
	pendiente	ord. origen	$R^2$	pendiente	ord.origen	$R^2$	pendiente	ord.origen	$R^2$
Metanol	0,015	0,0117	0,9994	7683,8	671,85	0,9896	14,087	365,67	0,9835
Metanol/agua (50:50 v/v)	0,0014	0,0176	0,9998	5364,1	12248	0,9925	16,907	3,4	0,9989
Metanol/agua acidificado (50:50 v/v, pH 2)	0,0013	0,0383	0,9976	7156,4	10930	0,987	34,228	435,04	0,9965
Metanol/agua (30:70 v/v)	0,0013	0,0878	0,9966	8064,6	-44887	0,9976	32,151	540,18	0,9992
Agua	0,0013	0,0124	0,9987	6878,4	887,84	0,9941	28,389	1938,8	0,9891
Acetona/agua (50:50 v/v)	0,0016	0,0398	0,9895	5141,8	10759	0,9938	35,73	300,75	0,9958

### 3.3.2 Efecto de ciertos constituyentes de los alimentos

Dos de los disolventes previamente analizados, el agua y la mezcla acetona/agua (50:50 v/v), se seleccionaron para estudiar el efecto que ciertos constituyentes habituales de los alimentos, sin comportamiento antioxidante, podían tener en los métodos de capacidad antioxidante analizados. La idea era determinar si podían generar falsos positivos y, por tanto, una sobreestimación de la capacidad antioxidante de un alimento. Los resultados obtenidos empleando agua como disolvente se muestran en la **Tabla 10**.

En primer lugar, se observa una clara diferencia entre el ABTS y el ORAC, por un lado, y el FRAP y el DPPH, por el otro. En los dos últimos, tan sólo la cisteína proporcionó un resultado positivo para el FRAP, y la arginina y la cisteína para el DPPH. Por el contrario, tanto en el ABTS como en el ORAC, todos los aminoácidos y la proteína proporcionaron resultados positivos, estadísticamente significativos en algunos casos. Los glúcidos seleccionados no dieron una respuesta positiva en ninguno de los métodos.

**Tabla 10.** Valores de ORAC, ABTS, FRAP y DPPH para soluciones acuosas de diferentes constituyentes de los alimentos.

Muestra	ORAC ( $\mu\text{M}$ trolox/g )	ABTS ( $\mu\text{M}$ trolox/g )	FRAP ( $\mu\text{M}$ trolox/g )	DPPH % inhibición *
Glucosa	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Pectina	18,94 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Ácido galacturónico	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Tirosina	4529,04 $\pm$ 256,17 <sup>b</sup>	5360,23 $\pm$ 270,47 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Triptófano	7127,03 $\pm$ 285,83 <sup>c</sup>	1020,7 $\pm$ 163,87 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Arginina	0 <sup>a</sup>	185,26 $\pm$ 9,18 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	7,93 $\pm$ 1,88 <sup>b</sup>
Cisteína	0 <sup>a</sup>	22822,1 $\pm$ 968,37 <sup>d</sup>	396,44 $\pm$ 90,92 <sup>b</sup>	19,2 $\pm$ 1,86 <sup>c</sup>
Albúmina	119,711 $\pm$ 12,4842 <sup>a</sup>	38,32 $\pm$ 1,64 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna implican la existencia de diferencias significativas.

\*con una concentración inicial de DPPH de 63  $\mu\text{M}$

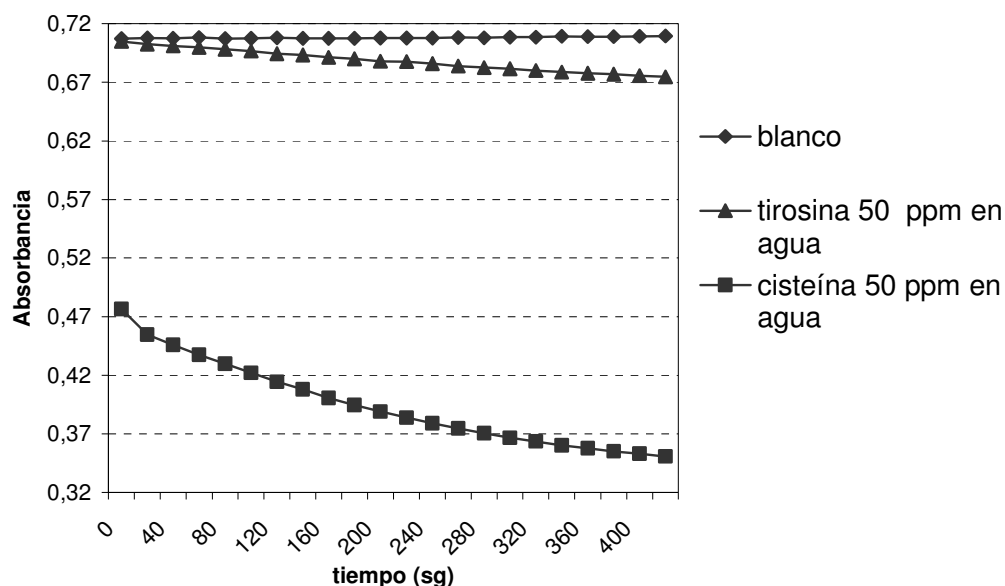
La tirosina y el triptófano, en particular, dieron resultados positivos en los métodos ORAC y ABTS, incluso a concentraciones muy bajas. Esto concuerda con un trabajo previo (Yilmaz & Toledo, 2005), en el que el aminoácido histidina por sí mismo generaba un elevado valor de ORAC. Esto parece indicar que las proteínas y los aminoácidos, presentes en concentraciones importantes en ciertos alimentos vegetales, como las legumbres, podrían producir interferencias considerables en estos ensayos de capacidad antioxidante, generando valores sobreestimados. La cisteína, por su parte, proporcionó un elevado valor en el ABTS, pero no dio respuesta en el ORAC.

La **Figura 21** muestra los resultados del método ABTS, a través de la evolución en la absorbancia a lo largo del tiempo, para un blanco, una solución de tirosina en agua de 50 ppm y una solución de cisteína en agua de 50 ppm. Se puede observar cómo, incluso a concentraciones tan bajas, la tirosina va produciendo a lo largo del tiempo un descenso en los valores de absorbancia, que son inferiores a los del blanco y la cisteína los reduce drásticamente, prácticamente a la mitad desde el comienzo. Resulta interesante señalar que, en el tiempo establecido, ninguno de los dos compuestos había llegado a una estabilización y los valores de absorbancia



continuaban bajando en cada nueva medida. Esto indicaría las limitaciones de efectuar las medidas del método ABTS a un tiempo fijo, aspecto que se discutirá posteriormente.

En conclusión, antes de aplicar tanto el ABTS como el ORAC a una muestra rica en proteínas, el contenido en ciertos aminoácidos debería ser evaluado.



**Figura 21.** Resultados de ABTS para un blanco, una solución de tirosina en agua de 50 ppm y una solución de cisteína en agua de 50 ppm

Además, aunque el objetivo de este trabajo era evaluar el posible efecto interferente que podían tener ciertos constituyentes de los alimentos en estos métodos, no se debería olvidar que todos ellos, salvo el DPPH, se aplican al plasma, una mezcla compleja en la que podrían estar también presentes muchas de estas interacciones. Por ejemplo, se ha visto que trazas de iones contenidas en fluidos biológicos o en productos naturales reducen el radical ABTS<sup>•+</sup> a la molécula orgánica no radicalica, independientemente de la acción de los antioxidantes y dando lugar a resultados sobreestimados (Ou et al., 2001)

El resultado para los mismos componentes utilizando como disolvente acetona: agua (50:50 v/v) se muestra en la **Tabla 11** (en este medio no fue posible disolver la pectina ni la albúmina). Las tendencias son las mismas que en el caso del agua, pero en esta ocasión los valores de ORAC y ABTS para la tirosina y el triptófano son

incluso superiores. En el caso del ORAC, la cisteína y la tirosina proporcionan un valor significativamente más bajo que el del triptófano, mientras que en el ABTS el valor más alto se obtiene con la tirosina.

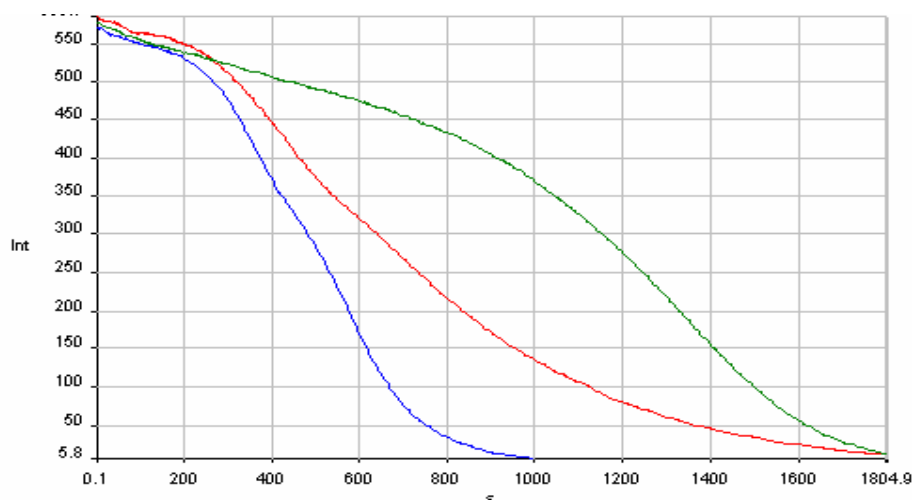
**Tabla 11.** Valores de ORAC, ABTS, FRAP y DPPH para soluciones en acetona: agua (50:50 v/v) de diferentes constituyentes de los alimentos.

Muestra	ORAC ( $\mu\text{M}$ trolox/g )	ABTS ( $\mu\text{M}$ trolox/g )	FRAP ( $\mu\text{M}$ trolox/g )	DPPH % inhibición *
Glucosa	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Ácido galacturónico	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Tirosina	5226.73 $\pm$ 486.67 <sup>b</sup>	1727.89 $\pm$ 27.92 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Triptófano	12154.52 $\pm$ 766.74 <sup>c</sup>	862.93 $\pm$ 49.42 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Arginina	0 <sup>a</sup>	405.02 $\pm$ 43.18 <sup>d</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Cisteína	1564.68 $\pm$ 192.66 <sup>b</sup>	946.74 $\pm$ 111.76 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna implican la existencia de diferencias significativas.

\*con una concentración inicial de DPPH de 63  $\mu\text{M}$

La **Figura 22** muestra el ejemplo de los gráficos obtenidos al aplicar ORAC a un blanco con acetona: agua (50:50 v/v), a una solución de tirosina 5 ppm en el mismo medio y otra de triptófano con la misma concentración y en el mismo medio. Se observa claramente cómo la tirosina aumenta el tiempo necesario para que la fluoresceína pierda toda su intensidad y cómo el triptófano, incluso a concentraciones tan bajas, es capaz de prolongar aún más este tiempo. Esto hace que, si el blanco tarda unos 1000 s en perder el 100% de intensidad, los dos aminoácidos tardan 1800 s, aunque con diferentes cinéticas, lo que le proporciona al final al triptófano un área neta bajo la curva muy superior a la de la tirosina.



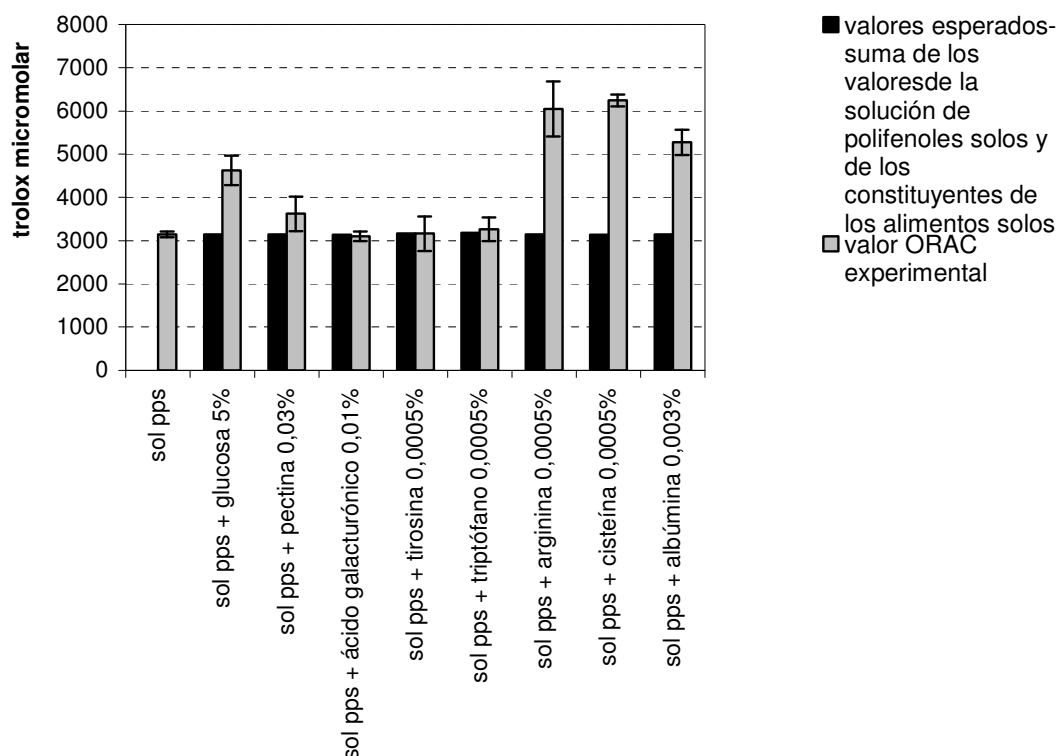
**Figura 22.** ORAC, de izquierda a derecha, de un blanco con acetona: agua (50:50 v/v), una solución de tirosina 5 ppm y una solución de triptófano 5 ppm en el mismo medio.

### 3.3.3 Efecto combinado del disolvente y de ciertos constituyentes de los alimentos

Finalmente, se determinó mediante los métodos en discusión la capacidad antioxidante de una mezcla de catequina: ácido gálico (5 $\mu$ M: 5 $\mu$ M para el método ORAC y 125 $\mu$ M: 125 $\mu$ M para el resto de métodos) en agua y en acetona: agua (50:50 v/v) cuando se añadían cada uno de los constituyentes de los alimentos previamente analizados de manera aislada. El objetivo de este experimento era determinar, en el caso del ORAC y el ABTS, si el valor resultante era la suma de los valores proporcionados por los polifenoles y por los constituyentes de los alimentos de manera aislada, o si se modificaba debido a nuevas interacciones entre los polifenoles y los constituyentes de los alimentos. En el caso del FRAP y el DPPH, el objetivo era ver si, aunque la mayoría de los constituyentes de los alimentos analizados no generaron ninguna respuesta cuando se analizaron de manera aislada, cuando estos componentes se mezclaban con una solución de polifenoles, daban lugar a nuevas interacciones que modificaban el valor original de la solución de polifenoles.

Se debe señalar el hecho de que cuando la arginina se mezcló con la solución acuosa de catequina: ácido gálico, que es incolora, ésta cambió a un color verde y después amarillo, debido a interacciones entre estos compuestos. Éste es un ejemplo del tipo de interacciones complejas que tienen lugar dentro de la matriz alimentaria.

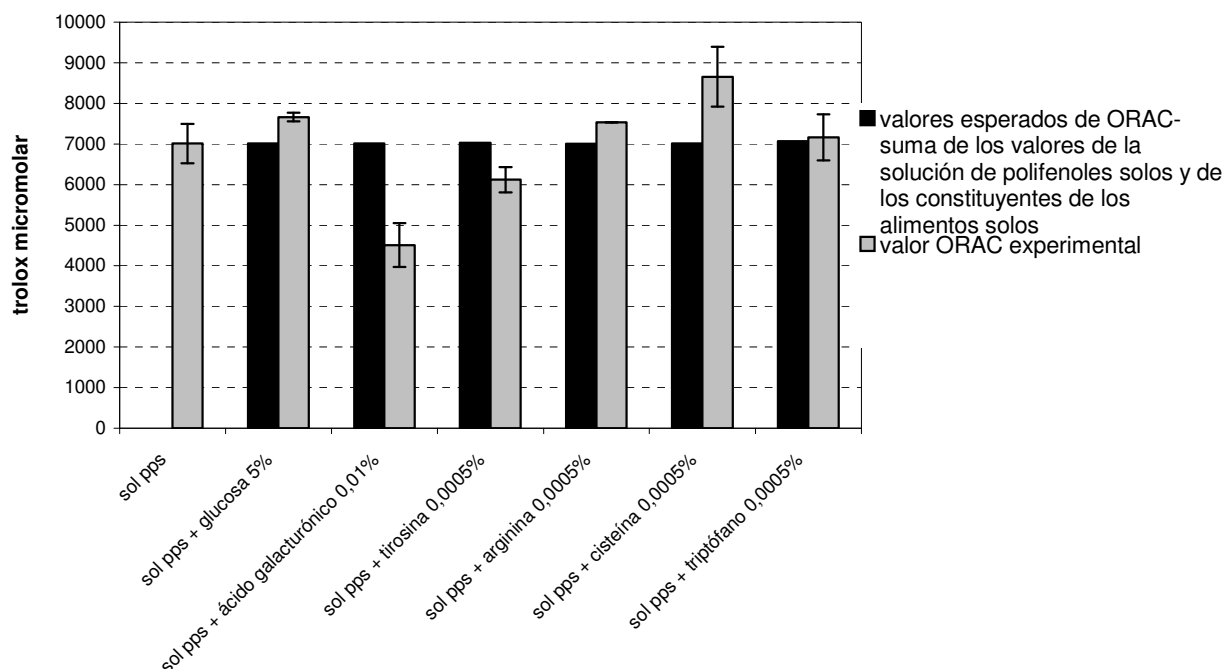
Los resultados del ensayo ORAC para la mezcla de polifenoles y constituyentes de los alimentos en la solución acuosa se pueden ver en la **Figura 23**, donde la columna titulada “valor esperado” muestra el valor de la suma del valor ORAC de la solución de polifenoles y el valor ORAC de las soluciones de constituyentes de los alimentos, y la columna titulada “valor real” muestra los resultados que de hecho tuvieron lugar en las mezclas conjuntas de polifenoles y constituyentes de los alimentos.



**Figura 23.** Valores de ORAC esperados y experimentales para una solución acuosa de catequina: ácido gálico 5  $\mu$ M: 5  $\mu$ M ("sol pps") mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos

En el caso del ácido galacturónico, la tirosina y el triptófano, los valores experimentales no fueron significativamente diferentes a los esperados. Sin embargo, en el caso de la glucosa, la arginina y la cisteína, que no habían producido valor ORAC por sí mismas, y en el de la albúmina, que había generado un valor muy bajo cuando se analizó sola, dieron lugar a un aumento considerable del valor ORAC cuando se mezclaron con los polifenoles. Esto indica la existencia de interacciones entre los polifenoles y los constituyentes de los alimentos que generan nuevas interferencias en el método ORAC.

A su vez, los resultados del ensayo ORAC para la mezcla de polifenoles y constituyentes de los alimentos al usar acetona/ agua (50:50 v/v) como disolvente, se muestran en la **Figura 24**.



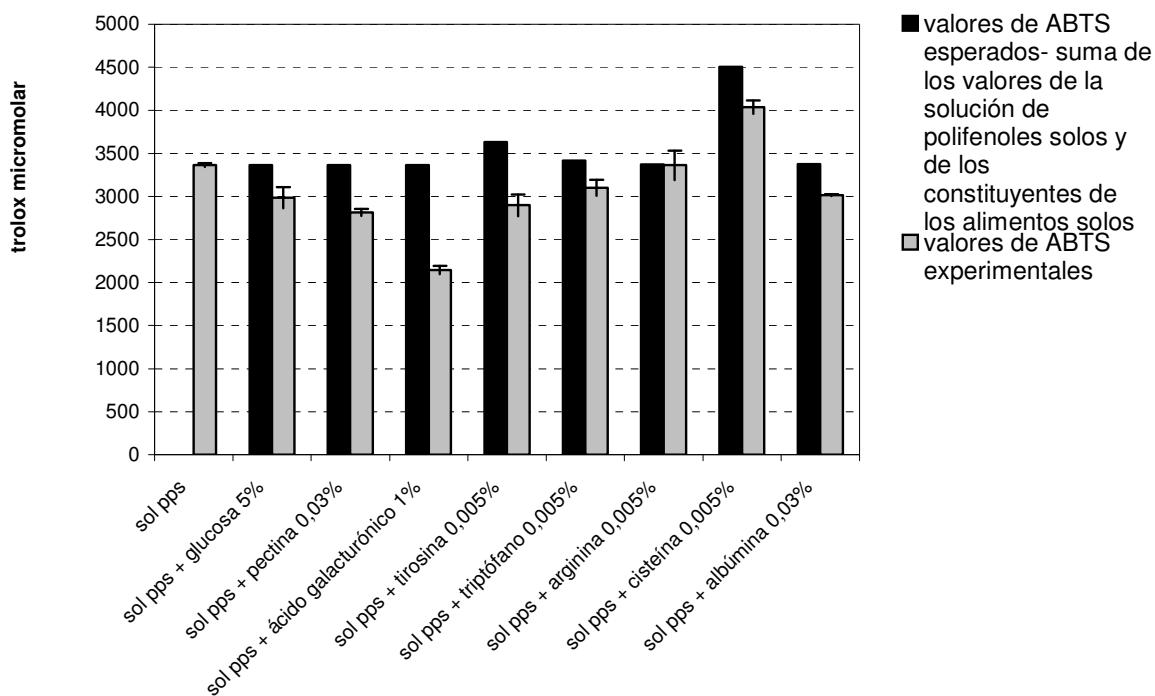
**Figura 24.** Valores de ORAC esperados y experimentales de una solución en acetona/agua (50:50 v/v) de catequina: ácido gálico 5  $\mu$ M: 5 $\mu$ M (“sol pps”) mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos

Se puede observar que los resultados experimentales para la mezcla de polifenoles con ácido galacturónico y tirosina fueron más bajos de lo esperado; las adiciones de glucosa y arginina generaron un valor ORAC ligeramente superior al esperado, y la adición de cisteína claramente tendió a aumentar el valor ORAC. De nuevo, esto evidencia que los mismos compuestos interaccionan de una manera diferente al modificar el disolvente.

En general, los valores ORAC obtenidos en acetona/agua (50:50 v/v) fueron más altos que los obtenidos en agua, lo que concuerda con las conclusiones obtenidas a partir de la **Tabla 9**, en el sentido de la distinta influencia que estos disolventes muestran en este método.

Se debe señalar que aunque sólo algunas de estas mezclas de polifenoles y constituyentes de los alimentos dieran lugar a valores significativamente diferentes respecto de los de la solución de polifenoles, algunos de ellos –tirosina, triptófano y albúmina- fueron analizados a concentraciones muy bajas, por lo que interferencias mucho mayores aparecerían a las concentraciones de estos compuestos que se pueden concentrar en extractos acuoso-orgánicos de alimentos. Por ejemplo, las concentraciones analizadas de tirosina y triptófano fueron del 0,0005%, mientras que la harina de trigo contiene un 0,54% de tirosina (Abdel-Aal & Hull, 2002) y el arroz un 0,21% de triptófano (Zhai, 2001)

Los valores de ABTS para las soluciones acuosas de polifenoles y constituyentes de los alimentos se muestran en la **Figura 25**. Todos los constituyentes de los alimentos analizados, salvo la cisteína, redujeron el valor de ABTS respecto al esperado, especialmente el ácido galacturónico, seguido por la pectina y la tirosina, que tenderían a producir una subestimación de la capacidad antioxidante de una muestra. Incluso los constituyentes de los alimentos que no produjeron un efecto por sí mismos modificaron los valores de la solución de polifenoles solos cuando se mezclaron con ella, así que de nuevo se observa la aparición de nuevas interacciones que afectan a los valores de capacidad antioxidante. Por otro lado, sólo la solución de arginina proporcionó un valor estadísticamente no diferente al de la solución de polifenoles solos.

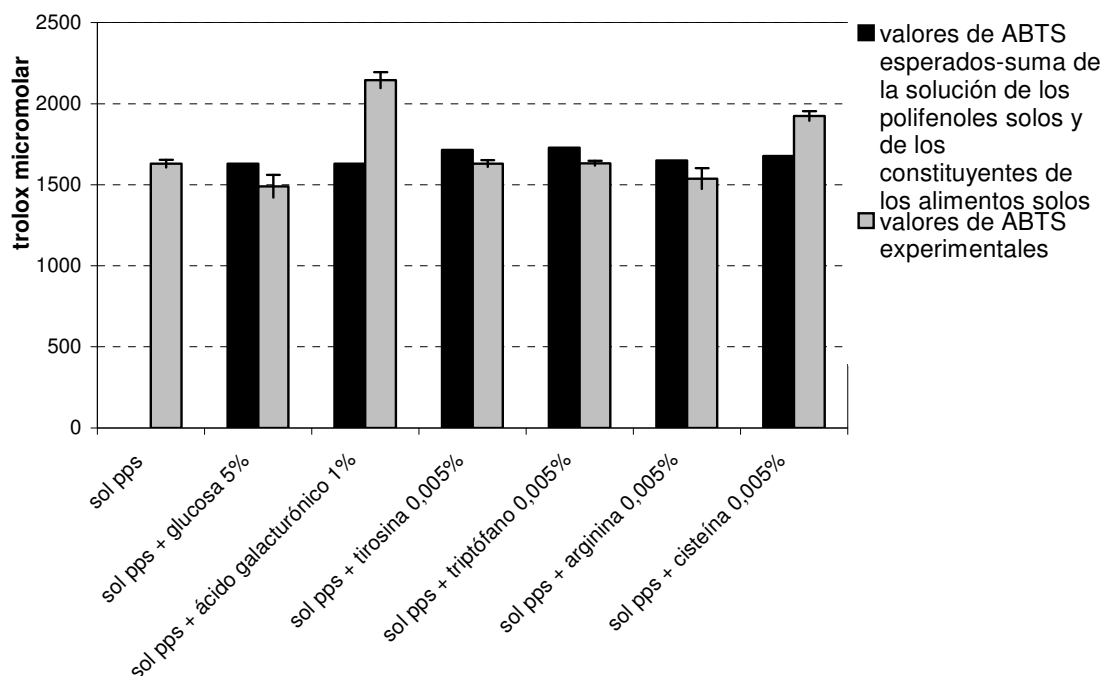


**Figura 25.** Valores de ABTS esperados y experimentales en agua de una solución de catequina: ácido gálico 125  $\mu\text{M}$ : 125  $\mu\text{M}$  ("sol pps") mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos

En este sentido, resulta interesante comentar que este efecto que muestran los aminoácidos reduciendo el valor de ABTS de los polifenoles concuerda con otro experimento realizado por Arts et al. (2001), en el que observaron que la capacidad antioxidante de plasma y quercetina determinada por ABTS era inferior a la suma de cada uno de los dos por separado. Cuando el plasma se desproteinizaba, se seguía observando el mismo efecto, aunque mucho menor, luego las proteínas del plasma reaccionarían con ciertos polifenoles, proporcionando una capacidad antioxidante experimental inferior a la esperada. Esto no ocurría con la vitamina E. Cuando se permitía que uno de los dos componentes (plasma o quercetina) reaccionara con el radical y después se añadía el otro, el efecto de enmascaramiento se reducía, luego ese efecto parecía producirse por un enlace directo entre el polifenol y la proteína u otras sustancias.

Los resultados para las mismas medidas realizadas utilizando como solvente la mezcla acetona: agua (50:50 v/v) se muestran en la **Figura 26**. En este caso, todos los valores experimentales fueron bastante similares a los esperados, salvo en la mezcla

de polifenoles con ácido galacturónico y con cisteína. Mientras que el ácido galacturónico reducía el valor de ABTS respecto al esperado en medio acuoso, lo aumentaba en la mezcla acetona/ agua (50:50 v/v). En el caso de la cisteína ocurrió lo contrario, mostrando una vez más que los constituyentes de los alimentos se comportan de manera diferente en función del medio en el que se hallen.



**Figura 26.** Valores esperados y experimentales de ABTS para una solución en acetona/agua (50:50 v/v) de catequina: ácido gálico 125  $\mu$ M: 125  $\mu$ M ("sol pps") mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos

Por lo que se refiere a la solución original de polifenoles, tan sólo la adición de tirosina y triptófano proporcionó valores significativamente diferentes a los de la misma.

En general, los valores de ABTS obtenidos en agua fueron superiores a los obtenidos en acetona/ agua (50:50 v/v), lo que concuerda con lo observado en la **Tabla 9**.

En cualquier caso, estas diferencias entre los valores esperados y los experimentales tuvieron lugar con una concentración de polifenoles 25 veces superior a la empleada para el ensayo ORAC y una concentración de aminoácidos 10 veces



superior, e incluso bajo estas condiciones las diferencias no fueron tan grandes como en el ensayo ORAC. Por tanto, se puede decir que las interferencias que ciertos constituyentes de los alimentos pueden causar en los métodos de capacidad antioxidante, a través de interacciones con el disolvente y con los polifenoles presentes en la muestra, es menor en el método ABTS que en el ORAC.

La **Tabla 12** muestra los resultados de FRAP y DPPH para una solución acuosa de catequina y ácido gálico y cada uno de los constituyentes de los alimentos analizados. En el ensayo DPPH, hubo interacciones claras entre los polifenoles y los constituyentes de los alimentos, dado que ninguno de estos había producido un efecto inhibidor por sí mismo, pero ahora alteraron el valor original  $EC_{50}$  generado por la mezcla de polifenoles. Todos los compuestos glucídicos (glucosa, ácido galacturónico y pectina) redujeron el  $EC_{50}$ , lo que indicaría, en el caso de un alimento, una falsa mayor capacidad antioxidante. Los aminoácidos, por su parte, tendieron a aumentar el valor de este parámetro, salvo la cisteína, que lo redujo, aunque no significativamente. Hubo también cambios importantes en los valores del  $tEC_{50}$ ; todos los constituyentes de los alimentos redujeron el valor inicial de 19,73 de la solución de polifenoles solos salvo el ácido galacturónico, que lo aumentó hasta 26,62 min. Estos cambios en el  $EC_{50}$  y en el  $tEC_{50}$  produjeron considerables modificaciones en el AE; por ejemplo, de un valor original de 0,74 para la solución de polifenoles a un valor de 1,74 tras añadir la cisteína.

**Tabla 12.** Valores de FRAP y DPPH de una solución acuosa de catequina: ácido gálico 125  $\mu$ M: 125  $\mu$ M (“sol pps”) mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos.

Muestra	FRAP	DPPH		
	( $\mu$ mol Trolox/g pps)	EC <sub>50</sub> (g pps /g DPPH)	t EC <sub>50</sub> (min)	AE
Sol pps	9559,2 $\pm$ 110,7 <sup>a</sup>	0,067 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	19,73 $\pm$ 1,45 <sup>d</sup>	0,75 <sup>a,b</sup>
Sol pps + glucosa 5%	9465,5 $\pm$ 797,8 <sup>a</sup>	0,055 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	11,84 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>	1,54 <sup>c</sup>
Sol pps + ácido galacturónico 1%	9281,7 $\pm$ 223,8 <sup>a</sup>	0,060 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	26,62 $\pm$ 1,58 <sup>d</sup>	0,62 <sup>b</sup>
Sol pps + pectina 0,03%	10049 $\pm$ 412,6 <sup>a</sup>	0,062 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	18,31 $\pm$ 0,77 <sup>b,c</sup>	0,88 <sup>b</sup>
Sol pps + albúmina 0,03%	9304,1 $\pm$ 341,1 <sup>a</sup>	0,077 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	14,08 $\pm$ 3,02 <sup>b</sup>	0,92 <sup>b</sup>
Sol pps + tirosina 0,005%	9298 $\pm$ 332,3 <sup>a</sup>	0,091 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>	8,8 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	0,6 <sup>a</sup>
Sol pps + arginina 0,005%	11891,36 $\pm$ 452,67 <sup>a,b</sup>	0,068 $\pm$ 0,0034 <sup>a</sup>	15,79 $\pm$ 2,99 <sup>a,b,c</sup>	0,93 <sup>b</sup>
Sol pps + cisteína 0,005%	30049,76 $\pm$ 3019,52 <sup>c</sup>	0,064 $\pm$ 0,0052 <sup>a</sup>	14,24 $\pm$ 4,77 <sup>b</sup>	1,74 <sup>c</sup>
Sol pps + triptófano 0,005%	9573 $\pm$ 134,3 <sup>a</sup>	0,082 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	15,6 $\pm$ 1,02 <sup>b,c</sup>	0,79 <sup>b</sup>

Letras diferentes en una misma columna implican la existencia de diferencias significativas.

Por el contrario, de los cuatro métodos comparados, el FRAP fue el ensayo en el que los cambios producidos al combinar los polifenoles y los constituyentes de los alimentos en una solución acuosa respecto a los valores de los polifenoles en el mismo medio, fue menor, a pesar de que existieron diferencias significativas entre los valores de la solución de catequina: ácido gálico y los de la misma al añadir arginina y cisteína. Esto podría estar relacionado con el hecho de que el FRAP es el único de los ensayos estudiados que se basa, no en la capacidad de captación de radicales libres, sino en la capacidad de reducción de metales, en concreto, del hierro. En cualquier caso, cuando la cisteína se añadió al medio, el valor original de la solución de polifenoles se multiplicó por tres. Por tanto, en cualquier caso, sería necesario combinar siempre más de un ensayo en la determinación de la capacidad antioxidante de una muestra, al interferir en todos ellos, en mayor o menor medida, constituyentes habituales de los alimentos, y, en el caso específico del FRAP, se debería evaluar el contenido en cisteína de la muestra.

Finalmente, los valores de ABTS y DPPH para la solución de polifenoles y constituyentes de los alimentos en acetona: agua (50:50 v/v) se muestran en la **Tabla**

**13.** En el método DPPH, todos los constituyentes de los alimentos analizados redujeron significativamente el valor  $EC_{50}$ , lo que llevaría a una sobreestimación de la capacidad antioxidante, y lo que muestra el diferente comportamiento de los mismos compuestos en diferentes medios. Por lo que se refiere a la cinética, los compuestos mostraron las mismas tendencias que en el agua; la glucosa, la tirosina y el triptófano redujeron el  $tEC_{50}$ , y el ácido galacturónico ejerció un ligero efecto retardante, generando un mayor  $tEC_{50}$ . De nuevo, estas modificaciones generaron cambios significativos en la eficacia antioxidante, un parámetro que expresa un balance entre la capacidad antioxidante de una muestra y el tiempo que necesita para actuar.

Como en el caso de la solución acuosa, en el medio acetona/agua (50:50 v/v) el FRAP fue el ensayo en el que existieron menos diferencias entre el valor original de la solución de polifenoles y las mezclas de esta solución con constituyentes de los alimentos. En cualquier caso, las diferencias para el FRAP en este medio fueron superiores a las observadas para el medio acuoso; todos los constituyentes de los alimentos analizados aumentaron el valor FRAP, mientras que en agua unos lo aumentaban y otros lo reducían. Y la arginina y, por encima de todos los demás, la cisteína, tendieron claramente a sobreestimar el valor FRAP, lo que, en el caso de la cisteína, significó que, cuando este aminoácido se añadió a la solución de polifenoles, multiplicó por nueve su valor original.

**Tabla 13.** Valores de FRAP y DPPH para una solución en acetona/agua (50:50 v/v) de catequina: ácido gálico 125  $\mu$ M: 125  $\mu$ M ("sol pps") mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos

Muestra	FRAP	DPPH		
	( $\mu$ mol Trolox/g pps)	$EC_{50}$ (g pps/g DPPH)	$tEC_{50}$	AE
Sol pps	10100.1 $\pm$ 489.7 <sup>a</sup>	0.083 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	19.44 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>	0.62 <sup>a</sup>
Sol pps + glucosa 5%	11513.3 $\pm$ 694.3 <sup>a</sup>	0.053 $\pm$ 0.0005 <sup>b</sup>	13.68 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	1.37 <sup>b</sup>
Sol pps + ácido galacturónico 1%	11726.1 $\pm$ 443 <sup>a</sup>	0.071 $\pm$ 0.002 <sup>c</sup>	29.46 $\pm$ 0.67 <sup>d</sup>	0.48 <sup>a</sup>
Sol pps + triptófano 0,005%	11302.9 $\pm$ 429.8 <sup>a</sup>	0.066 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>	16.19 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	0.93 <sup>c</sup>
Sol pps + arginina 0,005%	32123.5 $\pm$ 2119 <sup>b</sup>	0.068 $\pm$ 0.0034 <sup>c</sup>	15.79 $\pm$ 2.99 <sup>c</sup>	0.93 <sup>c</sup>
Sol pps + cisteína 0,005%	94046.47 $\pm$ 7688.8 <sup>c</sup>	0.051 $\pm$ 0.0036 <sup>b</sup>	34.48 $\pm$ 3.25 <sup>d</sup>	0.57 <sup>a</sup>
Sol pps + tirosina 0,005%	11302.9 $\pm$ 429.8 <sup>a</sup>	0.066 $\pm$ 0.004 <sup>c</sup>	17.8 $\pm$ 0.54 <sup>a,b</sup>	0.85 <sup>c</sup>

*En resumen,*

- *Los métodos más habituales de capacidad antioxidante pueden verse influenciados por el disolvente de extracción y por ciertos componentes de los alimentos no antioxidantes, de acuerdo con el siguiente orden: ORAC > ABTS > DPPH > FRAP.*

- *Los valores de capacidad antioxidante sólo se deberían comparar entre un mismo método y con un mismo disolvente de extracción*

- *La presencia de ciertos aminoácidos y ácidos urónicos en la muestra debería tenerse en cuenta antes de aplicar algunos de los métodos de medida de capacidad antioxidante in vitro.*

### **3.4 EXPRESIÓN CINÉTICA DE LOS RESULTADOS DEL MÉTODO ABTS DE DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

El ABTS y el DPPH son dos de los métodos más empleados en la determinación de capacidad antioxidante de alimentos. Ambos presentan un fundamento similar, al basarse en la capacidad de los antioxidantes presentes en una muestra para captar una molécula radicalica, lo que produce un cambio de color y una reducción en la absorbancia que es monitorizada.

Al mismo tiempo, existen diferencias en estos métodos que hacen que su uso pueda ser complementario. Por un lado, el DPPH<sup>•</sup> es un radical orgánico estable, que tiene existencia por sí mismo, mientras que el ABTS<sup>•+</sup> es un radical inestable, que se debe generar a partir de la molécula no radicalica y cuya vida media es muy inferior.

Por otro lado, también existen diferencias en cuanto a la naturaleza de los medios para los que cada uno de estos dos métodos resulta más apropiado. Así, el ABTS resulta más adecuado para extracciones con agua y ciertos disolventes orgánicos bastante polares, como el metanol o el etanol, es decir, antioxidantes de naturaleza básicamente hidrofílica, así como para muestras de plasma, para las que se lleva a cabo una adaptación y se disuelve el radical en tampón PBS. El DPPH, por su parte, aunque también es válido para extracciones acoso-orgánicas como las antes indicadas, permite su aplicación en aceites y extracciones efectuadas a partir del mismo (Espín et al., 2000), es decir, es válido para antioxidantes de naturaleza lipofílica, como pueden ser los carotenoides (Jiménez-Escrig et al., 2000). Sin embargo, no se puede aplicar a plasma.

Así mismo, existen diferencias respecto al modo de expresión de resultados en las dos técnicas. En el ABTS las lecturas de absorbancia son monitorizadas tras la adición de la muestra a la cubeta con el radical, durante un tiempo de unos 4-6 min. Sin embargo, tomando este punto final fijo no se tiene en cuenta el diferente comportamiento cinético que pueden presentar distintos antioxidantes y, de hecho, algunos autores han sugerido que la reacción podría no haber finalizado a ese tiempo para ciertos compuestos, como la crisina, ácidos di- y trihidroxifenólicos, etc. (Arts et al., 2004; Prior et al., 2005; Siquet et al., 2006) Por tanto, el orden de capacidad antioxidante obtenido para este tiempo no correspondería con el real, dado que algunos compuestos estarían aún desarrollando su reacción con el radical y puede

que logararan finalmente un % de inhibición superior al de otros compuestos, pero tras un tiempo más prolongado.

En este sentido, algunos trabajos han intentado introducir parámetros cinéticos en el ABTS, como comparar el lag-phase o tiempo necesario para que la absorbancia se empiece a reducir, de los diferentes antioxidantes (Yu et al., 1999) o establecer curvas de actividad basadas en el % de cantidades variables de radical que puede neutralizar una cantidad fija de antioxidante (Arts et al., 2004b)

Como se ha indicado previamente, nuestro grupo llevó a cabo una modificación del método DPPH con el objeto de introducir parámetros cinéticos en la expresión de resultados, como son el  $EC_{50}$ , el  $t_{EC50}$  y AE, que proporcionan una información más completa sobre el modo de acción de un antioxidante puro o de una mezcla compleja. Estos parámetros han sido ampliamente utilizados en la bibliografía por un gran número de grupos de investigación y para muestras muy diversas, como pueden ser la fibra del mango (Vergara-Valencia et al., 2007), metabolitos de hongos (Femenía-Ríos et al., 2006) o distintos vinos (Sánchez-Moreno et al., 1999)

El objetivo de este trabajo era aplicar estos mismos parámetros cinéticos al método ABTS, para determinar si podían proporcionar una información superior a la aportada por las medidas realizadas a un tiempo fijo. Para ello, se seleccionaron dos tipos de muestras: estándares de polifenoles y varios alimentos o subproductos derivados conocidos por su elevada capacidad antioxidante.

Se seleccionaron un conjunto de polifenoles pertenecientes a los distintos grupos existentes en función de su estructura química: el ácido gálico, como ácido benzoico; el ácido ferúlico y el cafeico, como ácidos hidroxicinámicos; el resveratrol como estilbeno; el ácido tánico como tanino hidrolizable; la catequina, la rutina y la quercetina como flavonoides, dentro de las cuales la quercetina es un flavonol, la catequina es un flavanol y la rutina es una flavona. También se analizaron el  $\alpha$ -tocoferol como ejemplo de antioxidante dietético de naturaleza lipofílica, el Trolox, un análogo hidrofílico del anterior, y el 3-tert-butil-4-hidroxianisol o BHA, un antioxidante sintético que se utiliza como aditivo alimentario.

Por lo que se refiere a las mezclas complejas de antioxidantes, se seleccionaron orujo de uva blanca y uva tinta, nuez y el alga comestible *Fucus vesiculosus*, productos que han mostrado una importante capacidad antioxidante en

distintos ensayos (Larrauri et al., 1998; Jiménez-Escrig et al., 2001; Pellegriniet al., 2006). Respecto a los compuestos responsables de esta actividad, en los orujos de uvas serían polifenoles extraíbles y taninos condensados, en la nuez polifenoles extraíbles y taninos hidrolizables y en *Fucus* distintos polisacáridos sulfatados, así como un grupo particular de compuestos de naturaleza fenólica, los fluorotaninos, de los que el más importante es el floroglucinol (Jiménez-Escrig et al., 2001; Fukuda et al., 2003; Iriti & Faoro, 2006). En el caso de la nuez, al poseer un importante contenido en grasa (66%) y, ante la posibilidad de que ésta tuviera un efecto en el ABTS - que, como se ha explicado, no es un método adecuado para muestras lipofílicas- se optó por desgrasarla, tras haber comprobado que la capacidad antioxidante asociada al aceite era negligible. A su vez, el desgrasado con éter de petróleo se efectuó a temperatura ambiente, para evitar una posible degradación de compuestos antioxidantes por efecto del calor.

Un objetivo secundario de este trabajo era efectuar una comparación entre estos parámetros cinéticos obtenidos a través del método ABTS con los descritos en la bibliografía para los mismos compuestos aplicando el método DPPH, así como comparar los datos de ABTS y DPPH obtenidos a un tiempo fijo, con el fin de determinar posibles diferencias en el comportamiento de los compuestos antioxidantes seleccionados hacia estos dos radicales.

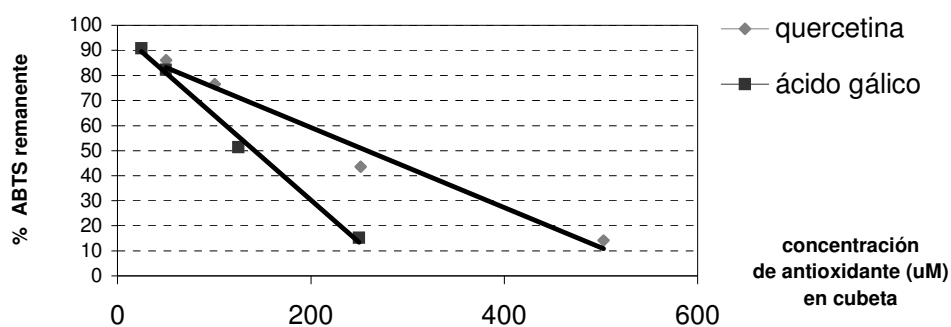
### **3.4.1 Patrones de antioxidantes**

La **Tabla 14** muestra los valores de las pendientes, las ordenadas en el origen y  $R^2$  ( $y = a + bx$ ) obtenidos para los distintos compuestos analizados, tras aplicar el procedimiento cinético antes descrito, siendo  $y$  el porcentaje de radical remanente y  $x$  la concentración de antioxidante. Cuanto mayor es la pendiente, menor es el ABTS<sup>•+</sup> remanente. Se puede observar que existen importantes diferencias entre las pendientes, parámetro que podría ser utilizado para comparar el comportamiento cinético de los diferentes antioxidantes.

Por ejemplo, el valor de la pendiente del ácido gálico es más del doble que el de la pendiente de la quercetina, lo que significa que pequeños cambios en la concentración tendrán un efecto superior en la reducción del radical libre en el caso del ácido gálico que en el de la quercetina, como ilustra la **Figura 27**.

**Tabla 14.** Pendiente, ordenada en el origen y  $R^2$  para las curvas ( $y = a + bx$ ) obtenidas para los diferentes antioxidantes, siendo  $y$  el porcentaje de radical remanente y  $x$  la concentración de antioxidante en la cubeta. También se muestran los parámetros  $EC_{50}$ , valor estequiométrico y átomos de H por molécula

Muestra	pendiente	ordenada en el origen	$R^2$	$EC_{50}$ (mmol/mmol ABTS <sup>•+</sup> )	valor estequiométrico	átomos de H por molécula
Ácido gálico	-0,338	97,89	0,993	$0,058 \pm 0,014$	0,12	8,5
Ácido tánico	-0,137	96,74	0,994	$0,01 \pm 0,0001$	0,02	50
Ácido ferúlico	-0,117	90,9	0,999	$0,11 \pm 0,003$	0,22	4,5
BHA	-0,084	93,72	0,997	$0,17 \pm 0,04$	0,34	3
Resveratrol	-0,151	90,92	0,996	$0,08 \pm 0,005$	0,16	6
Quercetina	-0,160	91,10	0,999	$0,07 \pm 0,002$	0,14	7
Ácido ascórbico	-0,074	97,33	0,998	$0,2 \pm 0,009$	0,40	2,5
Ácido cafeico	-0,077	94,91	0,989	$0,18 \pm 0,001$	0,36	3
DL- $\alpha$ -tocoferol	-0,074	91,22	0,991	$0,2 \pm 0,007$	0,40	2,5
Rutina	-0,096	97,26	0,974	$0,08 \pm 0,0003$	0,16	6



**Figura 27.** Curva dosis-respuesta para el ácido gálico ( $R^2 = 0,993$ ) y la quercetina ( $R^2 = 0,993$ ) frente a % de ABTS<sup>•+</sup> remanente



La **Tabla 14** también muestra los valores de  $EC_{50}$  para estas muestras. Cuanto menor es este parámetro, mayor es la capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos para estos patrones concuerdan con el orden de capacidad antioxidante descrito por otros autores (Rice-Evans et al., 1996; Pulido et al., 2000; Pannala et al., 2001; Heim et al., 2002; Briante et al., 2003; Zhou et al., 2006). En este sentido, el hidrolizable ácido tánico, con el mayor grado de hidroxilación, posee la mayor capacidad antioxidante. De la misma manera, el ácido gálico, que también presenta un grado de sustitución importante, muestra una importante capacidad antioxidante. Así mismo, el ácido ferúlico exhibe una capacidad antioxidante superior a la del cafeico, debido a la presencia de un grupo metoxilo que potencia las propiedades de donación de electrones. Por lo que se refiere a la quercetina y a la rutina, la primera es más antioxidante. La quercetina posee, al igual que la rutina, una estructura 3'-4'-dihidroxi en el anillo B y un doble enlace 2,3 en conjunción con el grupo 4-oxo en el heterociclo, permitiendo la conjugación entre los anillos A y B. Pero la molécula de quercetina también presenta grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 del anillo A, junto con una función 4-oxo en los anillos A y C, lo que potencia su capacidad antioxidante. También es destacable que el ácido ascórbico y el tocoferol, dos de los antioxidantes dietéticos más estudiados, proporcionaron valores de capacidad antioxidante inferiores a los de los compuestos fenólicos analizados.

A partir del  $EC_{50}$  se pueden obtener el valor estequiométrico y el número de átomos de H por molécula de patrón (Torres et al., 2002). Estos parámetros facilitan la comprensión de los mecanismos de la reacción que tiene lugar entre el antioxidante y el radical. En este caso, los moles de antioxidante que reaccionaron con un mol de  $ABTS^{•+}$  oscilaron entre 0,02 para el ácido tánico y 0,4 para el tocoferol y el ácido ascórbico. Esto significa que el ácido tánico es el antioxidante más eficiente de los analizados, ya que 1 mol de este compuesto es capaz de reducir 50 moles de radical, mientras que el tocoferol o el ácido ascórbico, los menos eficientes de los compuestos seleccionados, sólo son capaces de reducir 2,5 moles de  $ABTS^{•+}$ .

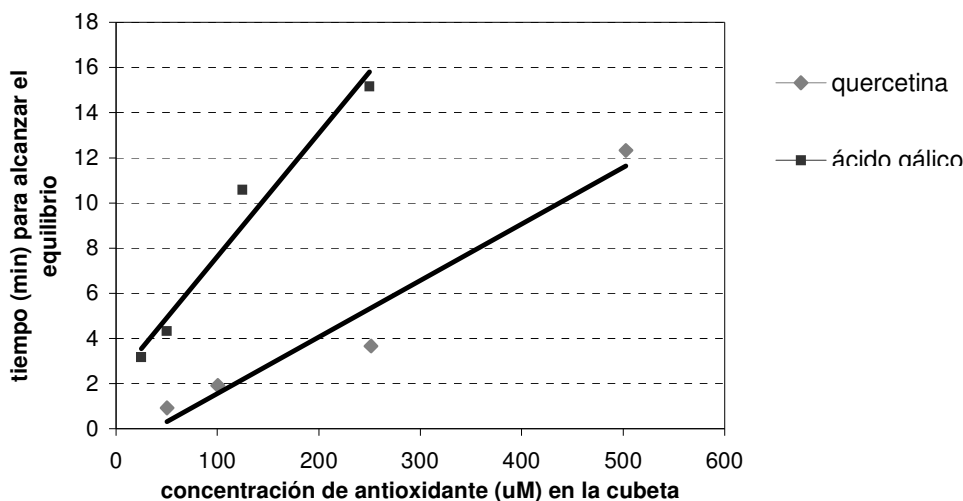
La **Tabla 15** muestra la pendiente, la ordenada en el origen y  $R^2$  para las curvas ( $y = a + bx$ ) obtenidas para los diferentes antioxidantes, siendo  $y$  el tiempo necesario para alcanzar una estabilización en los valores de absorbancia y  $x$  la concentración de antioxidante en la cubeta. En primer lugar, se puede ver que existen diferencias importantes entre las pendientes, esto es, que pequeñas modificaciones en las concentraciones de los antioxidantes pueden representar aumentos significativos en el tiempo necesario para alcanzar la estabilización. Por ejemplo, la **Figura 28**

representa el comportamiento cinético de la quercetina y el ácido gálico; la pendiente del ácido gálico es 20 veces mayor que el de la quercetina, lo que significa que para modificaciones similares en la concentración de cada uno de estos dos antioxidantes, el ácido gálico tardará más tiempo el alcanzar el estado de equilibrio.

**Tabla 15.** Pendiente, ordenada en el origen y  $R^2$  para las curvas ( $y = a + bx$ ) obtenidas para los diferentes antioxidantes, siendo  $y$  el porcentaje de radical remanente y  $x$  la concentración de antioxidante en la cubeta.

Muestra	Pendiente	Ordenada en el origen	$R^2$	$t_{ec50}$ (min)
Ácido ascórbico	0,0021	0,3913	0,506	$1,76 \pm 0,33$
DL- $\alpha$ -tocoferol	0,0017	0,1304	0,8377	$1,76 \pm 0,09$
BHA	0,0031	0,5978	0,6246	$2,8 \pm 0,32$
Quercetina	0,0025	-0,9549	0,9535	$5,44 \pm 0,46$
Ácido cafeico	0,0039	0,7083	0,9643	$7,4 \pm 0,99$
Rutina	0,018	-0,8929	0,6472	$7,4 \pm 0,99$
Ácido gálico	0,0546	0,9639	0,9636	$9,72 \pm 0,43$
Ácido tánico	0,0312	-0,0744	0,9983	$10,26 \pm 1,03$
Resveratrol	0,0357	3,5109	0,939	$13,95 \pm 0,36$
Ácido ferúlico	0,0324	1,6449	0,9999	$13,01 \pm 0,24$

El  $t_{EC50}$  representa el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio para la concentración de antioxidante necesaria para reducir el radical al 50% de su concentración inicial ( $EC_{50}$ )



**Figura 28.** Curva dosis-respuesta para el ácido gálico ( $R^2 = 0,9535$ ) y quercetina ( $R^2 = 0,9636$ ) frente a tiempo necesario para alcanzar el equilibrio

Por lo que se refiere a los valores de  $R^2$  obtenidos para estas curvas, en algunos de los compuestos que necesitaban menos tiempo para alcanzar el equilibrio, el valor fue considerablemente más bajo. Esto podría resolverse monitorizando la reacción para periodos de tiempo inferiores, ya que a los 0,25 min que se escogieron para este ensayo, estos compuestos con cinéticas rápidas pueden producir grandes descensos en la absorbancia entre un intervalo y el siguiente, impidiendo ver claramente el descenso lineal.

La **Tabla 15** también muestra los valores de  $t_{EC50}$ ; tan sólo una tercera parte de los compuestos analizados alcanzaron el equilibrio para la concentración  $EC_{50}$  en un tiempo inferior a 6 minutos, el que se toma habitualmente para llevar a cabo este ensayo y que, por tanto, sería insuficiente para conocer con más detalle el modo de acción de los antioxidantes.

Para comprobar lo anterior, la **Tabla 16** muestra los resultados del ensayo ABTS para los diferentes estándares, medidos a un tiempo fijo, como se ha medido habitualmente, así como los valores de eficiencia antioxidante (EA). Se puede ver que, cuando se consideran de manera simultánea tanto la concentración como el tiempo necesario para capturar el radical, lo que se expresa en el parámetro EA, los resultados difieren considerablemente de los obtenidos cuando la reacción se efectúa a un tiempo fijo. El ácido tánico, por ejemplo, que resultó ser el compuesto más activo al expresar los resultados a un tiempo fijo, en equivalentes Trolox, presenta la sexta posición en términos de EA, al actuar de un modo lento. Lo mismo ocurre con el ácido

gálico, el segundo antioxidante más eficiente en términos de equivalentes Trolox al estar altamente sustituido, pero que presenta una EA relativamente baja. Por el contrario, el ácido ascórbico, que no exhibe una capacidad antioxidante excesivamente alta en términos de equivalentes Trolox, tiene la mayor EA, al poseer un  $t_{EC50}$  de tan sólo 1,76 minutos.

**Tabla 16.** Resultados de los métodos ABTS y DPPH medidos a un tiempo fijo, así como eficiencia antioxidante para el ensayo ABTS para los diferentes estándares analizados.

Muestra	DPPH <sup>•</sup> ( $\mu$ molTrolox/ $\mu$ mol compuesto)	ABTS <sup>•+</sup> ( $\mu$ mol Trolox/ $\mu$ mol compuesto)	EA
Ácido gálico	1,67 $\pm$ 0,02	3,34 $\pm$ 0,43	1,77
Ácido tánico	8,81 $\pm$ 0,93	20,74 $\pm$ 1,41	9,74
Ácido ferúlico	0,7 $\pm$ 0,08	1,65 $\pm$ 0,05	0,7
BHA	0,76 $\pm$ 0,03	1,87 $\pm$ 0,05	1,08
Resveratrol	0,39 $\pm$ 0,03	2,28 $\pm$ 0,02	0,9
Quercetina	0,52 $\pm$ 0,001	1,43 $\pm$ 0,05	2,62
Ácido ascórbico	0,25 $\pm$ 0,004	1,28 $\pm$ 0,03	2,84
Ácido cafeico	0,2 $\pm$ 0,003	1,26 $\pm$ 0,11	0,75
DL- $\alpha$ -tocoferol	0,45 $\pm$ 0,05	1,12 $\pm$ 0,03	2,84
Rutina	0,36 $\pm$ 0,05	1,26 $\pm$ 0,07	1,69

Por otro lado, la comparación entre la capacidad antioxidante obtenida a un tiempo fijo y la obtenida a partir de medidas basadas en diferentes concentraciones de la muestra y su capacidad para captar el radical hasta que se produce el equilibrio ( $EC_{50}$ , **Tabla 14**) también presentan algunas diferencias. Por ejemplo, el BHA muestra

una capacidad antioxidante superior a la del ácido ferúlico cuando los resultados se expresan como equivalentes Trolox, pero inferior cuando se toma el valor  $EC_{50}$

Por otro lado, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio para una determinada concentración se puede utilizar para comparar la capacidad antioxidante de compuestos que presentan valores similares en medidas efectuadas a un tiempo fijo. Así, el ácido cafeico y el ascórbico presentan prácticamente la misma capacidad antioxidante en términos de equivalentes Trolox, pero el  $t_{EC50}$  del ácido cafeico es cinco veces superior al del ácido ascórbico.

En resumen, este enfoque cinético puede proporcionar más información acerca del comportamiento de los antioxidantes que las medidas tomadas a un tiempo fijo.

### **3.4.2 Comparación entre el ABTS y el DPPH**

Como el método DPPH es también ampliamente usado en la bibliografía para determinar la capacidad de captación de radicales libres de los antioxidantes, se consideró que podría ser interesante comparar los resultados obtenidos por este ensayo y por el ABTS para las mismas muestras, para ver si los antioxidantes muestran un comportamiento similar o diferentes hacia estos dos radicales.

Como se ha explicado, un trabajo previo del grupo (Sánchez-Moreno et al., 1998) aplicó al método DPPH la misma metodología que aquí ha sido expuesta para el ABTS. Los resultados que se obtuvieron en este trabajo fueron comparados con los obtenidos al aplicar una metodología cinética para el ABTS. El primer hecho que se observó es que el  $t_{EC50}$  era mucho más bajo para el ABTS que para el DPPH para todas las muestras analizadas, salvo para el ácido cafeico, lo que quiere decir que los antioxidantes reaccionan más rápido con el catión formado a partir del ABTS. Por ejemplo, el resveratrol presentó un  $t_{EC50}$  de 60,46 min. en su reacción con el DPPH, y de tan sólo 13,95 en el método ABTS; en el BHA, este tiempo pasó de 103,85 a 2,8, etc. Por tanto, esta metodología consumiría menos tiempo al aplicarla al método ABTS que cuando se aplica al método DPPH.

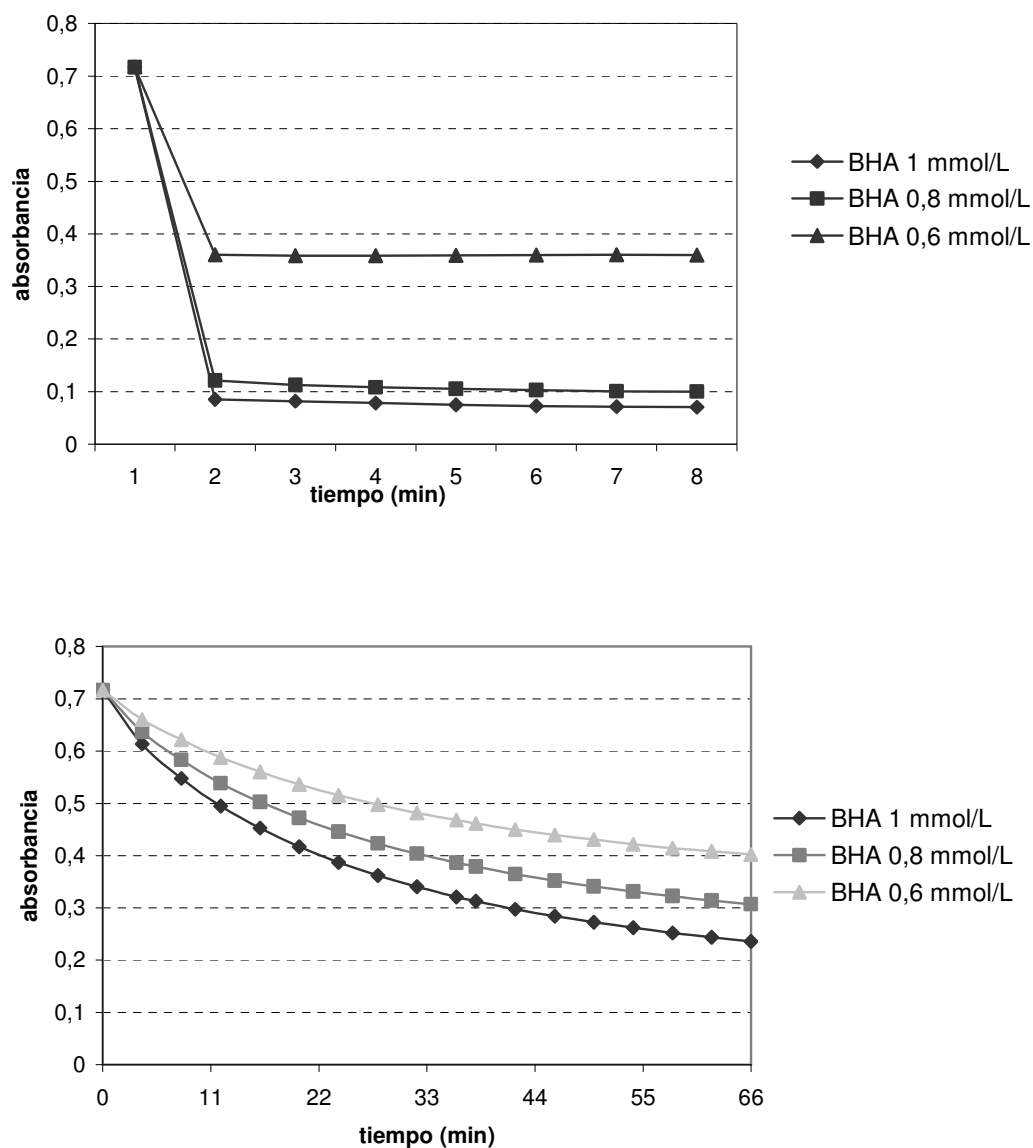
Por lo que se refiere a la capacidad antioxidante de las muestras, algunas de ellas mantuvieron su orden relativo de capacidad antioxidante de acuerdo con su  $EC_{50}$ , mientras otras modificaron considerablemente su reactividad dependiendo de con qué radical reaccionaran. Esto podría estar relacionado con algo que ha sido previamente mencionado por otros autores (Yoshida et al., 1989; Prior et al., 2005), el hecho de que

el impedimento estérico puede determinar la reacción de ciertos antioxidantes en el método DPPH. Esto podría explicar el hecho de que el ácido cafeico, con un grupo metoxi que incrementa el impedimento estérico, mostrara una mayor capacidad antioxidante en el método ABTS que en el DPPH, mientras que el ácido ferúlico, que posee un grupo hidroxilo en lugar del metoxi, actuara como un antioxidante más eficiente en el ensayo DPPH que en el ABTS.

Finalmente, dado el hecho de que, hasta el momento, la forma más común de expresar los resultados del método ABTS ha sido como equivalentes Trolox, tras parar la reacción a un tiempo establecido, se consideró la posibilidad de realizar el método DPPH del mismo modo, para facilitar la comparación con los datos bibliográficos. Éste es un aspecto importante, dado que los diferentes modos de expresión de los resultados publicados hacen muy difícil la comparación entre los mismos (Villaño et al., 2005). La **Tabla 16** muestra los resultados obtenidos cuando el DPPH se llevó a cabo a un tiempo fijo. Lo primero que se observa es el hecho de que el orden de capacidad antioxidante para el método DPPH a un tiempo fijo es bastante diferente al obtenido al aplicar parámetros cinéticos en el trabajo previo del grupo ya comentado (Sánchez-Moreno et al., 1998), dado que, al ser la reacción con el radical DPPH<sup>•</sup> bastante lenta, a los 6 minutos la reacción está todavía comenzando para muchos antioxidantes. Por tanto, para comparar entre sí valores de los métodos ABTS y DPPH, sería más adecuado utilizar en ambos casos la aproximación cinética.

En segundo lugar, en la **Tabla 16** se puede ver que los valores son mucho más bajos que los obtenidos utilizando las mismas condiciones que en el ensayo ABTS. Esto querría decir que los antioxidantes no sólo reaccionan más rápido, sino con más facilidad, con el radical DPPH<sup>•</sup> que con el ABTS<sup>•+</sup>. Esto se puede ver también en la **Figura 29**, que muestra los valores de absorbancia frente a tiempo para el antioxidante sintético BHA cuando reacciona con el radical DPPH<sup>•</sup> y cuando lo hace con el ABTS<sup>•+</sup>. Con el primero, concentraciones de entre 600 y 1000 µM no reducen la absorbancia por debajo de 0,25, mientras que el ABTS<sup>•+</sup> lo hace hasta 0,08. Ya se había sugerido con anterioridad (Arnao, 2000) que las diferencias entre los métodos ABTS y DPPH se podían deber al hecho de que el segundo utiliza una longitud de onda más próxima al visible, lo que podría resultar en una subestimación de la capacidad antioxidante de la muestra debido a la presencia de interferencias que también absorberían a esa longitud de onda. Así mismo, la reacción con el DPPH<sup>•</sup> necesita 68 minutos para estabilizarse, mientras que con el ABTS<sup>•+</sup> lo hace en 9 minutos (en cualquier caso, un tiempo superior

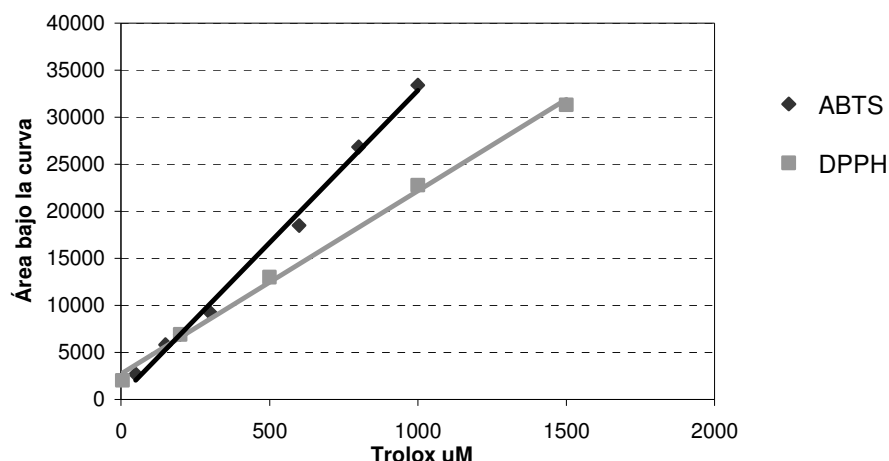
a los 6 minutos considerados habitualmente y que es aún mayor para otros compuestos antioxidantes, como se ha discutido previamente)



**Figura 29.** Evolución en la absorbancia frente al tiempo tras la reacción del antioxidante sintético con el radical ABTS\*\* (arriba) y con el DPPH\* (abajo)

Así mismo, al realizar una curva de calibrado de Trolox para ambos métodos (**Figura 30**) se observó que la relación entre los dos modelos no es proporcional. Para una concentración de Trolox de 500  $\mu$ M, el área bajo la curva en el método ABTS es de 18.000 y en el DPPH es de 12.000; cuando la concentración de Trolox es de 1000

$\mu\text{M}$ , la diferencia llega hasta 11.000 unidades. Es decir, cuanto más antioxidante sea el compuesto, mayor será la diferencia entre los valores obtenidos por los dos métodos, lo que se deberá tener en cuenta al compararlos entre sí.



**Figura 30.** Curvas de calibrado de Trolox para los métodos DPPH ( $R^2 = 0,997$ ) y ABTS ( $R^2 = 0,9951$ )

Esto demuestra que, incluso en métodos que supuestamente están basados en el mismo tipo de reacción, los antioxidantes pueden reaccionar con las distintas moléculas implicadas de un modo muy diferente. Por ejemplo, también se ha visto que, en la reacción con la catequina, el radical DPPH $^{\bullet}$  ataca al anillo B, mientras que el ABTS $^{+ \bullet}$  ataca al anillo A (Osman, Wong & Fernyhough, 2006). Todos estos resultados apoyan aún más la necesidad de combinar más de un método para determinar capacidad antioxidante.

### 3.4.3 Muestras ricas en antioxidantes

La metodología planteada para el método ABTS se aplicó a extractos acuosos-orgánicos de muestras ricas en antioxidantes, como son los orujos de uva blanca y tinta, la nuez y el alga *Fucus vesiculosus*. También se aplicó el método DPPH a las mismas muestras. Los resultados de ambos ensayos se muestran en la **Tabla 17**



**Tabla 18.** Capacidad antioxidante expresada cinéticamente de los métodos ABTS y DPPH de extractos acuoso-orgánicos de muestras ricas en antioxidantes.

	ABTS		AE	DPPH		
	EC <sub>50</sub> (g/g)	t <sub>EC50</sub> (min)		EC <sub>50</sub> (g/g)	t <sub>EC50</sub> (min)	EA
Orujo de uva blanca	0,35 ± 0,01	13,61 ± 0,98	0,21	2,19 ± 0,08	37,64 ± 1,96	0,01
Orujo de uva tinta	0,57 ± 0,01	13,95 ± 0,36	0,13	2,87 ± 0,07	35,67 ± 1,20	0,001
Nuez desgrasada	1,50 ± 0,009	12,86 ± 0,36	0,05	14,31 ± 0,07	30,49 ± 0,63	0,002
<i>Fucus vesiculosus</i>	0,59 ± 0,05	28,73 ± 2,8	0,06	3,5 ± 0,10	n.d.	n.d.

Los resultados de la nuez desgrasada se refieren a gramo de nuez completa

Respecto a la capacidad antioxidante proporcionada por cada muestra (EC<sub>50</sub>) se puede ver cómo, por ambos métodos, la mayor corresponde a los orujos de uva, seguidos del alga *Fucus* y de la nuez desgrasada, que presenta una capacidad antioxidante notablemente inferior. Sin embargo, dado que *Fucus* exhibe una cinética considerablemente más lenta que las otras muestras en el método ABTS, el valor final de AE es superior en el caso de la nuez (0,06) que en el de *Fucus* (0,05). En el caso de *Fucus*, no fue posible obtener el parámetro t<sub>EC50</sub> para el método DPPH, ya que se obtenían tiempos de equilibrio similares para concentraciones diferentes. Éste sería un factor a estudiar en el futuro, ya que no existe mucha información sobre el comportamiento cinético de las sustancias antioxidantes presentes en *Fucus* (flavonoides y polisacáridos sulfatados). En cualquier caso, esto no ocurrió con el método ABTS.

En las cuatro muestras se pudo aplicar el procedimiento cinético del ABTS sin que surgiera ningún problema, lo que muestra que sería un procedimiento adecuado para aplicar a un gran número de muestras ricas en antioxidantes de distinta naturaleza.

Por lo que se refiere a la comparación entre los valores obtenidos por los dos métodos, de nuevo se repite la tendencia que se había observado para los patrones, esto es, las muestras presentan menor capacidad antioxidante frente al DPPH que frente al ABTS y la cinética es más lenta. Así, el orujo de uva tinta pasa de un EC<sub>50</sub> de 0,57 ± 0,01 a 2,87 ± 0,07 g/g radical al aplicar el método ABTS o el DPPH, respectivamente, y su t<sub>EC50</sub> aumenta de 13,61 ± 0,98 minutos en el ABTS a 37,64 ±

1,69 minutos cuando reacciona con el radical DPPH<sup>•</sup>. Comportamientos similares se pueden observar en el resto de muestras analizadas.

Por tanto, al aplicar estos dos métodos a extractos de alimentos se deberían tener en cuenta, al comparar los valores entre sí, los mismos aspectos que al comparar resultados obtenidos en patrones.

*En resumen,*

- *En el tiempo habitualmente tomado para el ensayo ABTS, la mayoría de los compuestos antioxidantes no han completado su reacción, por lo que la consideración de parámetros cinéticos en este método ( $EC_{50}$ ,  $t_{EC50}$  y EA) podría proporcionar una mayor comprensión del comportamiento de los antioxidantes*
- *La aplicación de parámetros cinéticos a la expresión de resultados del método ABTS se ha podido llevar a cabo tanto en patrones de antioxidantes, como en muestras de distinta naturaleza ricas en polifenoles.*
- *Las diferencias en el comportamiento cinético de los radicales DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>••</sup> se deberían tener en cuenta al comparar entre sí los resultados de estos métodos, a pesar de que ambos se basen en la determinación de la capacidad de captación de radicales libres por un antioxidante.*

### 3.5 FIBRA ANTIOXIDANTE DE UVA COMO INGREDIENTE FUNCIONAL

La metodología *in vitro* para determinar capacidad antioxidante previamente discutida fue aplicada a la Fibra Antioxidante de Uva (FAU), un producto previamente estudiado por nuestro grupo en estudios en ratas y pollos (Martín-Carrión et al., 1999; Goñi & Serrano, 2005; Goñi et al., 2007).

En primer lugar, se determinó su composición proximal y contenido en compuestos antioxidantes, que aparecen en la **Tabla 18**. Se puede observar que se trata de un producto con un contenido muy importante en fibra dietética, resultado que concuerda con otros obtenidos en la bibliografía sobre contenido en fibra dietética en subproductos de la elaboración del vino (Llobera & Cañellas, 2006). Así mismo, posee una proporción fibra soluble: fibra insoluble de 1:4 y, a diferencia de otros productos disponibles en el mercado con un elevado contenido en fibra dietética, como puede ser el salvado de trigo, tiene un contenido muy importante en antioxidantes. Así, mientras que el salvado de trigo tiene un contenido en polifenoles del 0,28% (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005), la FAU lo tiene del en torno al 5%, teniendo en cuenta que puede haber pequeñas variaciones entre unas cosechas y otras. En cualquier caso, los polifenoles mayoritarios pertenecen al grupo de los taninos condensados.

**Tabla 18.** Composición proximal y compuestos bioactivos de la Fibra Antioxidante de Uva

	g/100g ms
Proteína	11,08 ± 0,46
Grasa	7,69 ± 0,49
Cenizas	5,25 ± 0,19
Humedad	4,48 ± 0,02
Fibra dietética soluble	15,53 ± 0,11
Fibra dietética insoluble	62,07 ± 3,01
Fibra dietética total	77,6 ± 3,01
Polifenoles extraíbles	4,93 ± 0,03
Taninos condensados	14,81 ± 0,19

Así mismo, se estudió la composición en monómeros de la fibra dietética, que se detalla en la **Tabla 19**, siendo xilosa y arabinosa los monosacáridos mayoritarios en la fracción soluble y xilosa y glucosa en la fracción insoluble.

**Tabla 19.** Azúcares neutros y ácidos urónicos de la Fibra Antioxidante de Uva

<b>Fracción soluble</b>	100 %
Glucosa	0,99%
Galactosa	4,21%
Manosa	2,46%
Xilosa	57,78%
Arabinosa	21,38%
Ramnosa	1,07 %
Ácidos urónicos	12,11 %
<b>Fracción insoluble</b>	100%
Glucosa	18,04%
Galactosa	8,35%
Manosa	12,58%
Xilosa	34,74%
Arabinosa	13,40%
Ramnosa	0,11%
Ácidos urónicos	12,78%

También se determinó la distribución de los polifenoles extraíbles entre los distintos grupos existentes (**Tabla 20**) Los polifenoles mayoritarios en la Fibra Antioxidante de Uva pertenecen al grupo de las catequinas, seguidos de los ácidos benzoicos, flavonoles y antocianidinas, que aparecen en proporciones similares y, en cantidades bastante inferiores, los ácidos hidroxicinámicos.

**Tabla 20.** Composición porcentual de compuestos polifenólicos de la Fibra Antioxidante de Uva

Grupo de polifenoles	% sobre el total
Ácidos benzoicos	16,02 $\pm$ 0,07
Catequinas	46,82 $\pm$ 1,32
Ácidos hidroxicinámicos	6,98 $\pm$ 0,05
Flavonoles	13,98 $\pm$ 1,1
Antocianidinas	16,19 $\pm$ 0,04

Finalmente, se procedió a la determinación de la capacidad antioxidante de la FAU, empleando las técnicas previamente descritas en esta Memoria, resultados que se muestran en la **Tabla 21**. Se determinó la capacidad antioxidante asociada tanto a polifenoles extraíbles (métodos FRAP, ABTS, DPPH y ORAC) como a taninos condensados (método ABTS), tras haber observado en el ensayo efectuado con cereales que una fracción importante de la capacidad antioxidante permanece asociada a los residuos de las extracciones. Así mismo, se aplicó la modificación previamente desarrollada del método ABTS para obtener parámetros cinéticos, siendo útil tanto para los polifenoles extraíbles como para los taninos condensados

Se debe señalar que todos los métodos se llevaron a cabo en extracciones efectuadas en los mismos disolventes y las curvas de calibrado de Trolox se realizaron también en los mismo disolventes, para minimizar los efectos asociados al disolvente que se habían observado previamente.

**Tabla 21.** Capacidad antioxidante asociada a los polifenoles extraíbles y a los taninos condensados de la Fibra Antioxidante de Uva

Compuestos	Método capacidad antioxidante	Resultados
Polifenoles extraíbles	FRAP ( $\mu\text{mol trolox/g ms}$ )	$273,90 \pm 10,60$
	ABTS ( $\mu\text{mol trolox/g ms}$ )	$124,37 \pm 0,35$
	ORAC ( $\mu\text{mol trolox/g ms}$ )	$214,27 \pm 37,29$
	DPPH	
	EC <sub>50</sub> (g ms/g DPPH)	$3,55 \pm 0,48$
	t <sub>EC 50</sub> (min)	$38,10 \pm 2,64$
	AE	0,0074
	ABTS	
Taninos condensados	EC <sub>50</sub> (g ms/g ABTS)	$2,267 \pm 0,012$
	t <sub>EC 50</sub> (min)	$69,04 \pm 0,57$
	AE	0,0064
	ABTS ( $\mu\text{mol trolox/g ms}$ )	$83,734 \pm 4,100$
	ABTS	
	EC <sub>50</sub> (g ms/g ABTS)	$2,066 \pm 0,050$
	t <sub>EC 50</sub> (min)	$31,59 \pm 0,28$
	AE	0,0153

Se debe destacar que la FAU presenta, por todos los métodos empleados, una elevada capacidad antioxidante en comparación con otros alimentos de origen vegetal estudiados por su contenido en antioxidantes. Así, la naranja tiene un ORAC de 51,7 ( $\mu\text{mol trolox/g ms}$ ) y la ciruela de 79,1 (Wang, Cao & Prior, 1996)

Por otro lado, una gran parte de la capacidad antioxidante de este ingrediente funcional estaría asociada a los taninos condensados –un 40% de acuerdo con el método ABTS-, siendo ésta no biodisponible en el tracto gastrointestinal, pero potencialmente fermentable por la microflora colónica.

*En resumen,*

- *La Fibra Antioxidante de Uva posee un contenido muy apreciable de fibra dietética, tanto soluble como insoluble.*
- *La Fibra Antioxidante de Uva posee una elevada capacidad antioxidante determinada por numerosos métodos, asociada tanto a polifenoles extraíbles como a taninos condensados.*

### **3.6 EFECTO EN FUMADORES DE LA FIBRA ANTIOXIDANTE DE UVA**

Un porcentaje muy elevado de la población, especialmente en los países desarrollados, es fumadora habitual, a pesar de estar considerado como un factor de riesgo independiente para las enfermedades pulmonares y del corazón, y para el cáncer, habiendo sido incluido por la Organización Mundial de la Salud entre los diez mayores riesgos para la salud (Northrop-Clewes & Thurnman, 2007)

El humo del tabaco es una mezcla de más de 4.000 sustancias químicas que pueden desarrollar complejas interacciones con el organismo. Una gran parte de estas moléculas son compuestos antioxidantes y, de hecho, se ha estimado que una sola calada expone al fumador a más de  $10^{15}$  radicales libres y oxidantes (Northrop-Clewes & Thurnham, 2007).

Todo esto hace que los fumadores se consideren un modelo de estrés oxidativo (Vigna et al., 2003) y que, en numerosos estudios, se haya observado que presentan, respecto a sujetos no fumadores, niveles superiores de aductos de MDA-ADN en la mucosa branquial (Northrop-Clewes & Thurnham, 2007); de aductos MDA-ADN en la mucosa oral (Zhang et al., 2002); de isoprostanos en plasma (Bruno et al., 2005; Helmersson et al., 2005; McNaulty et al., 2005); de 8-OhdG en tejido pulmonar que, además, se correlacionan con el número de cigarrillos consumidos diariamente (Asami et al., 1997); de 8-OhdG en la orina (Yao et al., 2004); una menor capacidad antioxidante plasmática (Bruno et al., 2005) y mayor presencia de especies reactivas de oxígeno en el semen (Saleh et al., 2002), así como una menor resistencia a la oxidación de LDLs (Liu et al., 2004). También se ha demostrado en ratas que los compuestos oxidantes presentes en el humo del tabaco son capaces de atravesar la pared alveolar de los pulmones, y que la exposición de estos animales al humo genera un aumento de los niveles de 3-nitrotirosina y de 8-OhdG (Yamaguchi et al., 2007) Así mismo, al exposición al humo del tabaco produce una activación del proceso de inflamación que, a su vez, potencia el estrés oxidativo (Bruno et al., 2005)

Resulta interesante señalar que, en muchos de los estudios anteriores, también se realizaron medidas en exfumadores, obteniendo valores que indicaban un menor estrés oxidativos que en los fumadores, pero que todavía no habían alcanzado los niveles de aquellos sujetos que nunca habían fumado.

Además, los sujetos fumadores siguen en muchas ocasiones unos hábitos de vida y, particularmente, dietéticos, menos saludables que los no fumadores (Oshaug et al., 1996; Alberg, 2002), lo que conlleva que, además de los efectos negativos en su status antioxidante asociados al propio consumo de tabaco, su ingesta de antioxidantes sea inferior. Por ello, la suplementación con productos ricos en antioxidantes podría ser beneficiosa para estas poblaciones, particularmente cuando se ha observado que, por ejemplo, sus recomendaciones dietéticas de ácido ascórbico serían superiores a las de los no fumadores, al tener en ellos el  $\alpha$ -tocoferol una tasa de degradación más rápida y ser necesario el ácido ascórbico para regenerarlo (Bruno et al., 2005)

Sin embargo, los estudios de intervención basados en la suplementación con ciertos antioxidantes aislados, como vitamina C, vitamina E o  $\beta$ -caroteno ha tenido resultados contradictorios o incluso negativos, particularmente en fumadores. Por ejemplo, la administración de estos compuestos aislados no ha mostrado un efecto en una reducción global del riesgo cardiovascular o de cáncer. Incluso se ha observado el efecto contrario; por ejemplo, el Ensayo de Prevención del Cáncer con  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno mostró un aumento del 11% en la incidencia el cáncer de pulmón entre los sujetos fumadores que tomaron  $\beta$ -caroteno (Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Trial Study Group, 1994) Incluso en estudios con compuestos aislados en los que se han obtenidos resultados positivos, las cantidades suministradas han sido tan elevadas que son difícilmente alcanzables en una dieta habitual, lo que apunta de nuevo a que los efectos epidemiológicos observados tienen que ser debidos a la suma de varios compuestos (Shanmuganayagan et al., 2002)

Por eso, el proporcionar los antioxidantes en la forma en que aparecen en la naturaleza, esto es, en matrices complejas como son los alimentos, donde aparecen combinados con otros compuestos bioactivos, podría ser más efectivo que la administración aislada de estos componentes. Podría ocurrir que algunos de estos compuestos actuaran de manera sinérgica pero no tuvieran acción individual, o que otros componentes de la dieta (como elementos traza) actuaran como efectores de la acción de los micronutrientes (Woodside et al., 2005)

Sin embargo, los estudios en los que se ha suplementado a fumadores con alimentos ricos en antioxidantes no han sido demasiado frecuentes, a pesar de que los resultados obtenidos han sido, en general, positivos (Cacetta et al., 2001; Dietrich et



al., 2002; Vigna et al., 2003; Hakim et al., 2004; Lee et al., 2005). En concreto, a pesar de que la uva tinta, el vino tinto y sus subproductos son fuentes naturales de antioxidantes muy conocidas, y que han mostrado efectos positivos en la reducción del estrés antioxidante en numerosos estudios (O'Byrne et al., 2002; Castilla et al., 2005), tan sólo tenemos noticia de dos en los que se suplementó a fumadores –sólo varones– con un extracto de procianidinas de uva (Vigna et al., 2003) y vino tinto, vino blanco o vino tinto sin alcohol (Cacetta et al., 2001).

Por todas estas razones, para estudiar los efectos de la ingesta de polifenoles en el status antioxidante de una población de fumadores, se decidió emplear Fibra Antioxidante de Uva (FAU), un producto natural rico en antioxidantes, en el que éstos se presentaran incluidos en una matriz compleja y no como compuestos aislados, y del que las cantidades ingeridas son fácilmente incorporables a una dieta habitual. Este producto había mostrado en estudios previos realizados por nuestro grupo en ratas resultados positivos en parámetros de riesgo cardiovascular, como el perfil lipídico (Martín-Carrón et al., 1999), en el status antioxidantes de contenidos cecales de ratas (Goñi & Serrano, 2005) y en la capacidad antioxidante de heces de pollos (Goñi et al., 2007)

Los detalles del diseño experimental han sido descritos en el apartado Materiales y Métodos. Brevemente, 40 fumadores (la mitad de los cuales con una media de 20 cigarrillos/día y la otra mitad con una media de 40 cigarrillos/día) se dividieron en dos grupos, de los cuales la mitad tomó durante 1 mes 7,5 g diarios de Fibra Antioxidante de Uva, y la otra mitad tomó, durante el mismo tiempo, 7,5 g de salvado de trigo como placebo, con el objetivo de poder diferenciar entre efectos producidos por la ingesta de fibra y otros asociados a la ingesta combinada de fibra y antioxidantes. Al empezar, a los 15 días y al mes se tomaron muestras de sangre en ayunas para evaluar parámetros bioquímicos generales, así como parámetros de status antioxidante.

Por lo que se refiere a la dosis diaria suministrada de FAU (7,5 g), ésta se seleccionó teniendo en cuenta que la cantidad actualmente consumida por la población española es de 18,35 g/día (Saura-Calixto & Goñi, 2004), lejos de las recomendaciones dietéticas de 25-30 g/día. Por tanto, esta dosis significaría aumentar de manera significativa la ingesta diaria de fibra dietética, aunque sin llegar a alcanzar todavía las recomendaciones de ingesta de fibra, por lo que no se esperaría ningún efecto negativo derivado de un consumo excesivo de fibra.

### 3.6.1 Efecto en parámetros bioquímicos

La **Tabla 22** muestra los resultados obtenidos para distintos parámetros plasmáticos de estado nutricional: creatinina, proteínas totales y ácido úrico.

**Tabla 22.** Resultados de parámetros de estado nutricional para el grupo FAU y el grupo placebo a lo largo del experimento.

	Ácido úrico (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)		Proteínas totales (g/dL)	
	FAU	placebo	FAU	placebo	FAU	placebo
tiempo 0	4,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	4,5 ± 1 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	7 ± 0,4 <sup>a</sup>	7 ± 0,2 <sup>a</sup>
15 días	4,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	4,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
30 días	4,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,5 ± 0,3 <sup>a</sup>

Distintos superíndices en una misma columna implican la existencia de diferencias significativas

Se puede observar cómo ni la ingesta de Fibra Antioxidante de Uva, ni del placebo –salvado de trigo– tuvo efectos negativos en el estado nutricional de los participantes, no produciéndose ningún cambio significativo en ninguno de los tres parámetros analizados. En el caso de las proteínas totales, se observó un descenso en los sujetos del grupo placebo, pasando de 7 ± 0,2 g/dL al inicio del estudio a 6,5 ± 0,3 g/dL al acabar el mismo, descenso que, no obstante, no fue estadísticamente significativo.

Por otro lado, se ha descrito como uno de los posibles efectos negativos de los polifenoles su capacidad para reducir la absorción del hierro (Tunpipipat et al., 2006). Por esta razón, se decidió estudiar los efectos que podía tener la ingesta de la Fibra Antioxidante de Uva en el metabolismo del hierro, por lo que se determinaron los niveles de hierro sérico, de ferritina y de transferrina. Los resultados aparecen en la **Tabla 23**.

**Tabla 23.** Resultados del estudio del metabolismo del hierro para el grupo FAU y el grupo placebo a lo largo del ensayo.

	Ferritina (ng/mL)		Hierro (µg/dL)		Transferrina (mg/dL)	
	FAU	placebo	FAU	placebo	FAU	placebo
tiempo 0	53 ± 54 <sup>a</sup>	60 ± 47 <sup>a</sup>	87 ± 37 <sup>a</sup>	108 ± 40 <sup>a</sup>	253 ± 32 <sup>a</sup>	262 ± 46 <sup>a</sup>
15 días	57 ± 58 <sup>a</sup>	58 ± 48 <sup>a</sup>	104 ± 59 <sup>a</sup>	99 ± 41 <sup>a</sup>	260 ± 47 <sup>a</sup>	260 ± 42 <sup>a</sup>
30 días	70 ± 66 <sup>a</sup>	64 ± 42 <sup>a</sup>	94 ± 52 <sup>a</sup>	104 ± 56 <sup>a</sup>	258 ± 45 <sup>a</sup>	256 ± 44 <sup>a</sup>

Distintos superíndices en una misma columna implican la existencia de diferencias significativas

En primer lugar, por lo que se refiere a la ferritina, se observa un mantenimiento de los valores en el grupo placebo y un aumento en la concentración en el grupo FAU, que pasó de 53 ± 54 ng/mL al inicio del estudio a 70 ± 66 ng/mL al final. Esta subida se debió básicamente a dos sujetos que multiplicaron de manera considerable sus niveles de esta proteína, pero no resultó significativa al aplicar la prueba T para muestras pareadas, ya que, de hecho, si se elimina estos dos sujetos, el valor final de ferritina en el grupo FAU fue de 61 ± 65 ng/mL. En cualquier caso, lo más destacable es que la ingesta de la FAU no alteró los niveles de esta proteína almacenadora de hierro.

Análogamente, ni en el grupo FAU ni en el placebo hubo cambios en las concentraciones de hierro ni de transferrina a lo largo del estudio, por lo que se puede concluir que, a pesar de que los polifenoles de ciertos alimentos han mostrado un efecto reductor en la biodisponibilidad del hierro, en el caso de la Fibra Antioxidante de Uva este efecto no tuvo lugar tras la ingesta durante 1 mes de 7,5 g/día.

Tras observar con estas medidas que la FAU no tuvo ningún efecto adversos en parámetros nutricionales ni de metabolismo del hierro, se determinaron sus efectos en el perfil lipídico y la glucosa plasmática, dado que numerosos ensayos *in vivo* han descrito efectos beneficiosos en estos parámetros debidos tanto a la fibra como a los antioxidantes. Los resultados obtenidos para el perfil lipídico (colesterol total, colesterol LDL, colesterol VLDL, colesterol HDL, triglicéridos) se muestran en la **Tabla 24**.

**Tabla 24.** Perfil lipídico para el grupo FAU y el grupo placebo a lo largo del ensayo. Distintos superíndices en una misma columna implican la existencia de diferencias significativas

	Colesterol total (mg/dL)		Colesterol LDL (mg/dL)		Colesterol HDL (mg/dL)		Colesterol VLDL (mg/dL)		Triglicéridos (mg/dL)	
	FAU	placebo	FAU	placebo	FAU	placebo	FAU	placebo	FAU	placebo
tiempo 0	202 ± 39 <sup>a</sup>	189 ± 34 <sup>a</sup>	136 ± 36 <sup>a</sup>	128 ± 16 <sup>a</sup>	50 ± 11 <sup>a</sup>	48 ± 14 <sup>a</sup>	16 ± 7 <sup>a</sup>	19 ± 10 <sup>a</sup>	82 ± 35 <sup>a</sup>	96 ± 50 <sup>a</sup>
15 días	202 ± 34 <sup>a</sup>	195 ± 24 <sup>a</sup>	136 ± 34 <sup>a</sup>	130 ± 22 <sup>a</sup>	49 ± 9 <sup>a</sup>	46 ± 15 <sup>a</sup>	18 ± 15 <sup>a</sup>	17 ± 10 <sup>a</sup>	91 ± 76 <sup>a</sup>	87 ± 49 <sup>a</sup>
30 días	203 ± 32 <sup>a</sup>	195 ± 23 <sup>a</sup>	127 ± 28 <sup>a</sup>	132 ± 20 <sup>a</sup>	50 ± 9 <sup>a</sup>	45 ± 16 <sup>a</sup>	19 ± 11 <sup>a</sup>	17 ± 10 <sup>a</sup>	95 ± 56 <sup>a</sup>	85 ± 50 <sup>a</sup>

Por lo que se refiere a los valores basales en los dos grupos, no existían diferencias significativas en ninguno de estos parámetros, a pesar de que el grupo placebo tenía unos valores de colesterol total algo inferiores y de triglicéridos algo superiores.

En ninguno de los parámetros lipídicos se produjeron cambios significativos a lo largo del ensayo, ni en el grupo FAU ni en el grupo control. En el caso de los triglicéridos, su valor aumentó de forma notable en el grupo FAU, pasando de  $82 \pm 35$  mg/dL al inicio a  $95 \pm 56$  mg/dL al acabar, mientras que en el grupo control se produjo una reducción, pasando de  $96 \pm 50$  a  $86 \pm 50$  mg/dL. Sin embargo, estas variaciones se debieron básicamente a algún individuo en cada grupo que modificó sus valores considerablemente, pero no resultaron significativas al aplicar la prueba T para muestras pareadas.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en numerosos estudios *in vivo* realizados con uva, vino tinto o derivados de los mismos, en los que se han observado efectos positivos en el perfil lipídico tras la ingesta de estos productos en sujetos sanos (Castilla et al., 2006), mujeres menopáusicas (Yem et al., 2005) o pacientes sometidos a hemodiálisis (Castilla et al., 2005), en todos los casos no fumadores.

Al mismo tiempo, los estudios de suplementación con antioxidantes del mismo tipo en fumadores han coincidido en no encontrar efectos en el perfil lipídico, por ejemplo, tras la ingesta durante 4 semanas de 300 mg de procianidinas de uvas (Vigna et al., 2003) o de vino tinto y vino tinto desalcoholizado, en un diseño cruzado, durante dos semanas (Cacceta et al., 2001). Tampoco se han obtenido cambios positivos en el perfil lipídico de fumadores tras suplementar con otras fuentes de antioxidantes, como el té verde, durante 4 semanas (Lee et al., 2005)

Esta coincidencia en los resultados podría indicar que en los fumadores, al existir un estrés oxidativo aumentado, los polifenoles proporcionados con estos suplementos deben destinarse a neutralizar a los radicales libres en el organismo y no son capaces de desarrollar otros mecanismos por los que se han relacionado con un descenso en el colesterol plasmático (Bravo et al., 1994a; Bravo et al., 1994b; Pal et al., 2004; Naumann et al., 2006). El metabolismo de los fumadores y el modo en el que pueden interaccionar con él los antioxidantes dietéticos es un proceso que debe ser estudiado con más profundidad.

Por otro parte, todos los estudios indicados de suplementación a fumadores con antioxidantes, así como el presente, han tenido una duración relativamente corta – en torno a 4 semanas-, por lo que también podría ocurrir que los polifenoles necesitaran un tiempo más prolongado, particularmente en el caso de sujetos fumadores, para producir el efecto hipocolesterolémicos que ha sido descrito en numeroso trabajos.

Finalmente, y dentro del análisis de la bioquímica plasmática, se determinó la evolución en la glucosa libre a lo largo del ensayo; los resultados se pueden ver en la **Tabla 25**.

**Tabla 25.** Resultados de glucosa plasmática para el grupo FAU y el grupo placebo a lo largo del ensayo.

	Glucosa (mg/dL)	
	FAU	placebo
tiempo 0	$88 \pm 8^a$	$89 \pm 9^a$
15 días	$81 \pm 12^a$	$96 \pm 12^b$
30 días	$88 \pm 10^a$	$96 \pm 12^b$

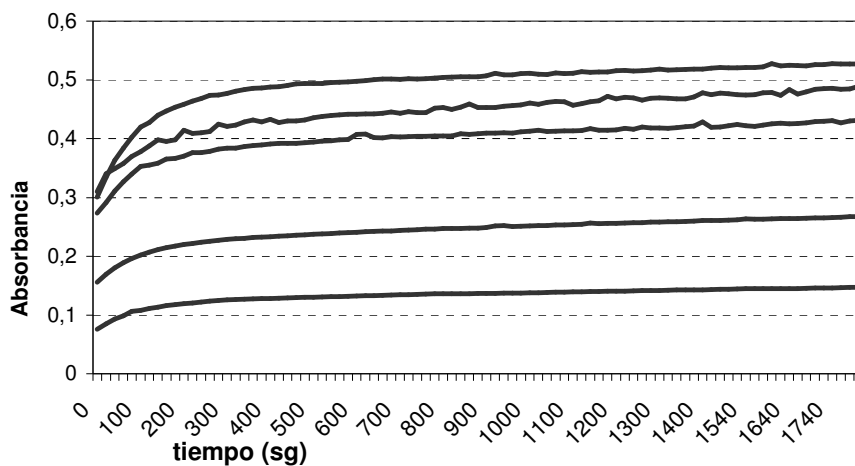
Distintos superíndices en una misma columna implican la existencia de diferencias significativas

Al comenzar el estudio, el grupo FAU y el grupo placebo presentaban valores similares de glucosa plasmática, de  $88 \pm 8$  y  $88 \pm 9$  mg/dL, respectivamente. El grupo FAU mantuvo valores constantes a lo largo del ensayo, mientras que en el grupo placebo hubo un aumento significativo, a  $96 \pm 12$  mg/dL a los 15 días de tomar el salvado de trigo, valor que se mantuvo hasta el final del ensayo. Este aumento en la glucosa plasmática de aquellos sujetos que tomaron 7,5 g/día de salvado de trigo en lugar de Fibra Antioxidante de Uva se debe difícilmente a causas analíticas, al no producirse la misma variación en el grupo FAU y, además, al haberse reclutado los participantes en el ensayo en distintos periodos de tiempo; por las mismas causas, no se puede pensar en una variación estacional, además de que se trata de un periodo de tiempo demasiado corto para poder considerar modificaciones en el patrón dietético. Éste fue un resultado inesperado, ya que los trabajos publicados indican un efecto hipoglucémico de la fibra dietética (Salmerón et al., 1997; Chandalia et al., 2000), aunque no tenemos noticia de ninguno desarrollado específicamente en fumadores. En cualquier caso, se debería confirmar en posteriores estudios, para confirmar que no fue fruto del azar.

### 3.6.2 Efecto en el status antioxidante

El status antioxidante de los sujetos participantes en este ensayo se determinó en base a tres parámetros diferentes: la capacidad antioxidante, evaluada por los métodos FRAP y ABTS, y la peroxidación lipídica, determinada por la concentración plasmática de MDA. Como se ha indicado en la sección Materiales y Métodos, estos métodos se aplicaron por triplicado a todas las muestras analizadas y se calculó el error asociado a cada uno de ellos, no tomándose en consideración variaciones en los mismos incluidas dentro de esos márgenes de error.

En primer lugar, cabe destacar que la capacidad antioxidante plasmática es un parámetro que presenta una variabilidad importante entre sujetos adultos sanos. En este sentido, la **Figura 31** muestra los valores del método FRAP de capacidad antioxidante plasmática al inicio del estudio para cinco de los participantes en el ensayo, observándose claramente diferencias en los valores basales. Por tanto, independientemente de las limitaciones asociadas a la determinación de la capacidad antioxidante *in vivo* que se han descrito en los Antecedentes de esta Memoria, se puede ver cómo estos métodos resultan aptos para detectar variaciones entre individuos.



**Figura 31.** Resultados del método FRAP al inicio del ensayo en 5 de los participantes.

Así mismo, desde el punto de vista metodológico, se debe indicar que las medidas de capacidad antioxidante en plasma se deben llevar a cabo utilizando siempre el mismo agente anticoagulante, ya que, si bien el EDTA puede actuar como quelante, limitando la actividad de ciertas enzimas con metales en sus centros activos

y, por tanto, subestimando la capacidad antioxidante, la heparina puede liberar superóxido dismutasa, sobreestimando los valores reales (Goode et al., 1995). En este caso, el anticoagulante elegido fue EDTA.

Los resultados del método FRAP y ABTS, para el grupo FAU y el grupo placebo, aparecen en la **Tabla 26**.

**Tabla 26.** Capacidad antioxidante plasmática para el grupo FAU y el grupo placebo a lo largo del ensayo.

	FRAP ( $\mu\text{mol Trolox/L plasma}$ )		ABTS ( $\mu\text{mol Trolox/L plasma}$ )	
	FAU	placebo	FAU	placebo
tiempo 0	$576 \pm 167^a$	$639 \pm 221^a$	$3618 \pm 1225^a$	$4368 \pm 1257^a$
15 días	$508 \pm 128^a$	$649 \pm 205^a$	$3967 \pm 1315^a$	$4834 \pm 1952^a$
30 días	$610 \pm 224^a$	$629 \pm 152^a$	$3734 \pm 1172^a$	$4367 \pm 1913^a$

Distintos superíndices en una misma columna implican la existencia de diferencias significativas

En ninguno de los dos métodos se observaron cambios significativos en la capacidad antioxidante plasmática a lo largo del ensayo. Así, el grupo FAU pasó de un valor inicial de FRAP de  $576 \pm 167 \mu\text{mol Trolox/L plasma}$  a uno final de  $610 \pm 224 \mu\text{mol Trolox/L plasma}$ , mientras que en el ABTS pasó de  $3618 \pm 1225$  a  $3734 \pm 1172 \mu\text{mol Trolox/L plasma}$ , y el grupo placebo presentó una evolución de  $639 \pm 221$  a  $629 \pm 152$  y de  $4368 \pm 1257$  a  $4367 \pm 1913 \mu\text{mol Trolox/L plasma}$ , respectivamente.

Los estudios sobre los efectos en la capacidad antioxidante plasmática de fumadores tras la suplementación a fumadores con alimentos ricos en antioxidantes han resultado contradictorios, obteniéndose resultados positivos en algunos casos (Roberts, Gordon & Walker, 2003; Vigna et al., 2003) y negativos en otros (Moschandreas et al., 2002; McNaulty et al., 2005). Los resultados también han sido contradictorios en lo que se refiere a los niveles plasmáticos de antioxidantes concretos (Alberg et al., 2002; Liu et al., 2004; Bruno et al., 2005; Gackowski et al., 2005). Estos hechos muestran que los distintos mecanismos homeostáticos implicados en el mantenimiento de la capacidad antioxidante, en particular en sujetos fumadores, con un estrés oxidativo incrementado, hacen que pueda resultar más complicado observar variaciones en estos parámetros que en otros biomarcadores de estrés oxidativo.



La **Tabla 27** muestra los valores obtenidos de MDA plasmático, un biomarcador de oxidación lipídica.

**Tabla 27.** MDA plasmático en el grupo FAU y en el grupo placebo a lo largo del ensayo.

	MDA ( $\mu\text{mol}$ /L plasma)	
	FAU	placebo
tiempo 0	$2,36 \pm 0,99^a$	$2,13 \pm 0,62^a$
15 días	$2,46 \pm 1,03^a$	$2,42 \pm 0,49^b$
30 días	$2,21 \pm 0,95^a$	$2,22 \pm 0,47^a$

Distintos superíndices en una misma columna implican la existencia de diferencias significativas

En primer lugar, se debe señalar que se determinó la correlación entre los valores de FRAP, ABTS y MDA (correlaciones FRAP-ABTS, FRAP-MDA y MDA-ABTS), obteniéndose en los tres casos correlaciones significativas ( $p \leq 0,001$ ), a pesar de que las  $R^2$  eran bastante bajas (0,443 para FRAP-ABTS, 0,212 para FRAP-MDA y 0,131 para ABTS-MDA).

Por lo que se refiere a los valores de MDA, en el grupo experimental, la ingesta de la Fibra Antioxidante de Uva no produjo ninguna modificación significativa de los niveles de este biomarcador, que a los 15 días de la ingesta experimentó una ligera subida, para terminar en unos valores algo inferiores a los del inicio. En el grupo placebo, por el contrario, que mostró al comienzo del estudio unos valores algo más bajos que los del grupo control ( $2,13 \pm 0,62$ , frente a  $2,36 \pm 0,99 \mu\text{mol}$  /L plasma), hubo un aumento significativo a los 15 días –alcanzando unos niveles similares a los del grupo FAU–, variación que no se mantuvo al final del estudio, donde los valores obtenidos fueron ligeramente superiores a los del inicio, pero similares a los del grupo FAU, por lo que no se piensa que esa modificación inicial tenga mayor significancia biológica.

Estos resultados no coinciden con los de otros estudios de suplementación a fumadores con antioxidantes en los que, como ya se ha comentado, no se observan cambios en el perfil lipídico y las modificaciones en la capacidad antioxidante plasmática no son coincidentes, pero, en general, sí se detectan cambios positivos en biomarcadores de oxidación. Observando las diferencias entre esos ensayos y el

nuestro, se puede ver que proporcionan cantidades mayores del alimento, como 4 tazas diarias de té verde (Lee et al., 2005) o que utilizan biomarcadores que pueden ser más sensibles, como isoprostanos en orina (Cacetta et al., 2001), 8-OHdG (Hakim et al., 2004) o marcadores de inflamación (Lee et al., 2005), etc.

Respecto a la idoneidad de los biomarcadores, es interesante comentar un trabajo (Klaunig et al., 1999; Bamonti et al., 2006) en el que se determinaron los niveles de MDA libre, ligado y total de fumadores y no fumadores tras la ingesta durante un mes de un concentrado de frutas y verduras y donde se produjo un descenso significativo del MDA libre y un aumento significativo del MDA ligado en los fumadores, lo que indicaría la formación de complejos entre los antioxidantes y el MDA libre - la forma potencialmente tóxica-, que después se eliminarían a través de la orina. Sin embargo, en el MDA total no se observaron variaciones a lo largo del ensayo, por lo que la detección por separado de las distintas fracciones del MDA podría proporcionar una información mucho más completa. Así mismo, en otro trabajo en el que se suplementó con té verde durante un mes a grupos de fumadores de China y de EEUU y se midió MDA total, no se observaron cambios significativos en el plasmático, pero sí en el urinario (Klaunig et al., 1999)

Por otro lado, hay factores que pueden jugar un papel muy importante en un ensayo de este tipo, como han señalado distintos autores, y que no se tuvieron suficientemente en cuenta en el diseño de este estudio. Así, en un estudio de suplementación a fumadores con vitamina C sólo se observaron efectos positivos en los isoprostanos plasmáticos en los sujetos con IMC (Índice de Masa Corporal) elevado (Dietreich et al., 2002), pero nosotros no determinamos este parámetro en nuestros participantes.

De la misma manera, en un trabajo en el que se suplementó a fumadores con una hamburguesa con un alto contenido en verduras liofilizadas o con zumo de frutas y verduras, sin encontrar ningún cambio en marcadores de oxidación, los autores concluyeron que se debería haber hecho un seguimiento de la dieta a lo largo del ensayo (Van den Berg et al., 2001), factor que nosotros tampoco consideramos.

Por tanto, todos estos factores se deberían tener en cuenta a la hora de planificar un ensayo sobre efectos en salud de la suplementación con antioxidantes.

Finalmente, no se debe olvidar, que, como ya se ha señalado previamente, el mayor estrés oxidativo presente en los fumadores puede hacer más difícil ver cambios en el status antioxidante de estos sujetos que en el de no fumadores. Por ejemplo, en dos estudios sobre los efectos de aceite de oliva enriquecido en polifenoles, en el más largo y con mayores cantidades de aceite, en el que participaron fumadores, no se observaron cambios en el MDA plasmático (Moschandreas et al., 2002), mientras que en el más corto y con menos aceite de oliva, en el que participaron hombres no fumadores, sí se detectó un descenso significativo del mismo biomarcador (Weinbrenner et al., 2004). Tampoco se observaron cambios en los isprostanos plasmáticos tras suplementar a fumadores durante 3 semanas con 250 g/día de arándanos (McNaulty et al., 2005)

*En resumen,*

- *La suplementación a fumadores con 7,5 g/día de Fibra Antioxidante de Uva durante 1 mes no supuso ninguna alteración adversa en el metabolismo del hierro.*
- *No obstante, tras la suplementación a fumadores con 7,5 g/día de Fibra Antioxidante de Uva durante 1 mes no se detectó ningún cambio significativo en el perfil lipídico, la glucemia o el status antioxidante.*
- *El estrés oxidativo incrementado en fumadores puede dificultar el observar cambios en el status antioxidante de estos sujetos.*
- *Futuros ensayos de este tipo deberían hacerse durante periodos de tiempo más prolongados, considerando un número mayor de marcadores de estrés oxidativo y de inflamación y un mayor control de la dieta de los voluntarios a lo largo del ensayo.*

### **3.7 EFECTO EN PARÁMETROS DE RIESGO CARDIOVASCULAR DE LA FIBRA ANTIOXIDANTE DE UVA**

Ciertos procesos crónicos, como las enfermedades cardiovasculares, se han convertido en las últimas décadas en una de las principales causas de mortalidad en los países desarrollados. Esto ha provocado un aumento de la investigación sobre las causas que provocan estos procesos, su posible prevención, la relación entre factores genéticos y factores ambientales, etc.

Un gran número de estudios epidemiológicos han observado una relación entre la ingesta de una dieta rica en frutas, verduras, legumbres, cereales integrales y pescado con una reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, en el Estudio de los Profesionales de la Salud, realizado en EEUU se observó que aquellos sujetos que seguían una dieta denominada “occidental”, con una ingesta elevada de carne roja y procesada, cereales refinados, dulces, postres, patatas fritas y productos lácteos enteros, presentaban niveles plasmáticos más elevados de insulina, péptido C, leptina y homocisteína, así como niveles más bajos de folato, factores todos ellos relacionados con el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico (Fung, Hu & Pérez-Jiménez., 2001; Fung et al., 2001) Así mismo, se ha estimado que un 31% de las enfermedades cardiovasculares a nivel mundial se producen por una baja ingesta de frutas y verduras (Lock et al., 2005)

El consumo de vino tinto ha sido relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares, en particular desde el establecimiento de la denominada “paradoja francesa”, cuando se observó que en ciertas regiones de Francia, a pesar de seguirse una dieta rica en grasas saturadas, existía una prevalencia de enfermedades cardiovasculares inferior a la de otras regiones con un consumo inferior de grasas saturadas. Tras realizar un estudio multivariante, se determinó que el consumo de vino tinto es el único factor dietético correlacionado negativamente con la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Renaud & Lorgèril, 1992) Este efecto del vino tinto se ha relacionado tanto con su contenido en alcohol como por su alto contenido en polifenoles, compuestos que también están presentes en la uva tinta.

Esta observación epidemiológica produjo un creciente interés por los efectos en la salud tanto del vino tinto como de su materia prima, la uva tinta, así como los distintos subproductos obtenidos en la elaboración del vino. De hecho, en Estados

Unidos en el año 1999 existían ya 43 productos comerciales obtenidos a partir de estos subproductos (Shrikhande, 2000)

Por otro lado, la fibra es otro componente de los alimentos que también ha mostrado numerosos efectos positivos en la salud. La fibra dietética está formada por dos fracciones: la soluble (constituida por pectinas solubles,  $\beta$ -glucanos, gomas y mucílagos) y la insoluble (que contiene pectinas insolubles, lignina, celulosa y hemicelulosas). La fibra dietética tiene las siguientes propiedades, de acuerdo con la revisión realizada por Saura-Calixto en 1997:

- Contribuye a la sensación de saciedad del estómago.
- Posee capacidad de absorber o retener agua, lo que aumenta el volumen del bolo fecal y reduce el tiempo de tránsito.
- Puede ser fermentada por la flora intestinal, originando ácidos grasos de cadena corta (butírico, acetato y propiónico), con efectos beneficiosos para el organismo.
- Absorbe ácidos biliares, disminuyendo los niveles séricos de lípidos.
- Al ralentizar la digestión, la glucosa se absorbe más lentamente y es necesaria menos insulina.

De hecho, se ha planteado que un aumento en la ingesta diaria de 10 gramos de fibra dietética, podría reducir hasta en un 27% el riesgo de muerte por enfermedad coronaria y hasta en un 14% el riesgo de sufrir cualquier evento coronario (Pereira et al., 2004)

Por todas estas razones, se decidió utilizar en un ensayo en humanos Fibra Antioxidante de Uva (FAU), un producto natural que combina fibra y antioxidantes.

Ya se ha planteado previamente cómo los ensayos con compuestos bioactivos aislados han sido desechados, al no considerar las complejas interacciones que tienen lugar en la matriz alimentaria, y al ser proporcionados en ocasiones los compuestos bioactivos en cantidades tan elevadas, que sus efectos antioxidantes se transformaban en prooxidantes. Sin embargo, resulta interesante señalar también que, a pesar de las amplias evidencias epidemiológicas sobre una relación inversa entre la ingesta de una dieta rica en frutas y verduras y la reducción de riesgo cardiovascular, los estudios *in vivo* con alimentos de origen vegetal ricos en antioxidantes siguen proporcionando resultados contradictorios, en ocasiones no obteniendo ningún resultado significativo

tras la suplementación con alimentos ricos en antioxidantes, como productos elaborados a partir de la soja (Woodside et al., 2006) o incluso encontrando un efecto negativo en ciertos marcadores de estrés oxidativo, en un ensayo en vivo sobre los efectos del consumo de cebolla y té negro, productos ricos en quercetina (O'Reilly et al., 2001). Igualmente, sigue existiendo una controversia sobre cuál debería ser la duración de los ensayos sobre los efectos *in vivo* de los antioxidantes, cuáles son las mejores técnicas para medir sus efectos, etc. (Dragsted et al., 2005; Serafini et al., 2005)

Así mismo, algunos de los estudios de intervención basados en la suplementación con alimentos de origen vegetal, aunque han obtenido resultados positivos respecto a los niveles plasmáticos de antioxidantes, proporcionaban cantidades diarias de los mismos difícilmente asimilables en la dieta habitual, como ocho raciones diarias (Zin et al., 1997), incluso diez (Cao et al., 1998) difícilmente alcanzables de manera habitual.

En el caso de la uva, un gran número de ensayos han abordado los efectos de su consumo en el riesgo cardiovascular, ya sea como zumo de uva o como vino tinto. Las **Tabla 28 y 29** muestran un resumen de algunos de los estudios de intervención llevados a cabo durante los últimos 10 años con estos productos, en el primer caso con animales (ratas, monos, conejos y hamsters) y en el segundo con humanos (incluyendo sujetos sanos, mujeres pre- y post-menopáusicas, sujetos hipertensos y sujetos hemodializados); las principales conclusiones obtenidas de los mismos se consideraran mas adelante, al comentar los resultados obtenidos en este ensayo clínico. No obstante, es interesante señalar que, aunque recientemente se ha demostrado la presencia en el vino tinto de fibra dietética (Díaz-Rubio & Saura-Calixto, 2006), cualquiera de estos productos, a pesar de su alto contenido en antioxidantes, tienen un contenido en fibra muy inferior al de la Fibra Antioxidante de Uva. Por otro lado, la duración de muchos de estos estudios ha sido bastante corta, generalmente tan solo un par de semanas. Incluso algunos de estos estudios han sido agudos, lo que ha llevado a no obtener ningún resultado, y que los propios autores sugirieran que los efectos de los polifenoles en el organismo sólo sean posibles tras un consumo crónico (Djousse et al., 1999)

<u>Estudio</u>	<u>Diseño</u>	<u>Efecto</u>
Osman et al., 1998	Sujetos: 5 monos Duración: 1 semana tomando cada uno de los productos con una semana de lavado entre medias Sup: 5 mL/kg de peso y día de zumo de uva/ pomelo/naranja	El zumo de uva redujo significativamente la agregación plaquetaria inducida por colágeno y ADP, mientras que el de pomelo no lo hizo de manera significativa, y el de naranja la aumentó (no significativamente)
Xia, Allenbrand & Sun, 1998	Sujetos: ratas Duración: 2 meses Sup: nada/etanol/polifenoles de uvas y etanol/ polifenoles de uvas	Reducción de la agregación plaquetaria en los 3 grupos experimentales al inducir la por trombina, pero no al inducir la por PMA. El etanol aumento la oxidación ex vitro de LDLs, los polifenoles no tuvieron ningún efecto, y la combinación de ambos la redujo.
Martin-Carrión et al., 1999	Sujetos: 24 ratas Duración: 1 semana adaptación dieta + 4 semanas Sup: nada / 10% dieta producto comercial rico en polifenoles (1,63 %) y fibra (50 %) de uva / dieta con colesterol / dieta con colesterol y producto comercial.	En la dieta sin colesterol, aumento de HDLs, índice HDL: LDL y reducción del índice aterogénico al incorporar el producto comercial. Al suplementar la dieta con colesterol, descenso colesterol total, colesterol LDL, índice aterogénico y aumento del índice HDL:LDL
Yamakoshi et al., 1999	Sujetos: 38 conejos Duración: 8 semanas Sup: nada/ dieta con colesterol/ dieta con 1% extractos uvas y colesterol/ dieta con 0,1% extractos uvas y colesterol/ dieta con 1% Probucol y colesterol	Ausencia de efecto en el perfil lipídico y en el MDA plasmático. Descenso del MDA en la aorta y del desarrollo de la aterosclerosis en los grupos con extractos de uva y con Probucol. En los grupos con extractos de uvas, descenso en la oxidación del plasma por AAPH, pero no en LDLs, ni reducción de la oxidación de plasma o LDLs por Cu (en grupo con Probucol, reducción de la oxidación en los 4 casos)

**Tabla 28.** Resumen de estudios *in vivo* en animales de los últimos diez años suplementando con uva, vino o subproductos de la elaboración del vino.

<u>Estudio</u>	<u>Diseño</u>	<u>Efecto</u>
Martin-Carrión, Saura-Calixto & Goñi, 2000	Sujetos: 80 ratas con dieta sin/con colesterol Duración: 42 días Sup: control con celulosa/piel de uva tinta/piel de uva blanca/semilla de uva blanca (todas con 54-59% de fibra dietética)	Aumento de excreción de grasas y proteínas sin que afectara a la excreción de peso ni a la ganancia proteica. Reducción de colesterol total LDLs al tomar los suplementos en las dietas con colesterol, y de triglicéridos al tomar los suplementos en la dieta sin colesterol.
Diebolt et al., 2001	Sujetos: 24 ratas Duración: 7 días Sup: 20 mg/kg de peso y día de un producto con 5% glucosa o de 2 extractos diferentes de polifenoles de vino tinto	Reducción en la P arterial, inducción de la síntesis de COX-2 y de i NOS
Auger et al., 2002	Sujetos: 32 hamsters con dieta aterogénica Duración: 8 semanas Sup: 7,14 mL/kg de peso y día de agua/etanol /47,1% de polifenoles de vino tinto en agua o en etanol	En los que tomaron polifenoles, reducción de colesterol, triglicéridos, apoB, acumulación de células espumosas en la aorta, aumento de capacidad antioxidante plasmática. Efectos mayores en los que tomaron los polifenoles en etanol.
Bernatova et al., 2002	Sujetos: 48 ratas 6 controles. 42 controles tomaron L-NAME durante 3 semanas y después se dividieron en 3 grupos: - 6 fueron sacrificadas. - 18 fueron divididas en 3 grupos que volvieron a su dieta normal 1, 2 y 3 semanas después. - 18 fueron divididas en 3 grupos que tomaron polifenoles de vino tinto durante 1, 2 y 3 semanas	Tras la hipertensión inducida por L-NAME, la bajada en P sistólica fue mayor en las que tomaron polifenoles, llegando a niveles por debajo del control. Las ratas que dejaron de tomar L-NAME experimentaron una normalización en la síntesis proteica, pero no en la fibrosis cardiaca, mientras que en las que tomaron polifenoles se observaron los dos efectos.

**Tabla 28** (continuación)



<u>Estudio</u>	<u>Diseño</u>	<u>Efecto</u>
Soares de Moura et al., 2002	Sujetos: ratas Duración: 28 días en ratas hipertensas proporcionando L-NAME y 13 días en ratas hipertensas proporcionando DOCA. Sup: 100 mg/kg y día de extracto de piel de uva con 5,5% de polifenoles extraíbles, o nada	En ambos grupos, reducción de P sistólica y P diastólica. Efecto vasodilatador del extracto de uva en el lecho vascular mesentérico.
Al-Awwadi et al., 2004	Sujetos: 45 ratas Duración: 6 semanas Sup: nada (C) / dieta rica en fructosa (F) / rica en fructosa + 10 mL/kg de peso y día de extracto de vino tinto (47,1% polifenoles extraíbles) en agua (FP) / rica en fructosa + 10 mL/ kg de peso y día etanol 10% (FE) / rica en fructosa + 10 mL/ kg peso y día extracto de vino (47,1% polifenoles extraíbles) en etanol 10% (FPE)	No variación en glucosa ni en insulina, pero en F se produjo un aumento en la resistencia a la acción de la insulina; FP proporcionaba valores intermedios entre C y F, y FPE volvía a los valores de C. Aumento de P arterial en F, pero no en los 3 grupos suplementados. Aumento en la producción del anión superóxido en F y PE, pero no en FP ni FPE.
Auger et al., 2004	Sujetos: 40 hámsteres con dieta hipercolesterolémica Duración: 12 semanas Sup: nada/ 7,14 mL/ kg peso y día de extracto de semilla de uva blanca rico en procianidinas o extracto de uvas tintas y blancas rico en procianidinas, o extracto de semillas de uvas (contenido en polifenoles extraíbles de los extractos, 55,6-86,4%)	Reducción del colesterol total en los grupos suplementados. Reducción del desarrollo de la aterosclerosis en los grupos con extractos. Ausencia de efecto en Apo A1, ApoB y capacidad antioxidante plasmática.
Auger et al., 2005	Sujetos: 32 hámsteres con dieta aterogénica Duración: 12 semanas Sup: agua/ etanol/vino tinto (570 mg polifenoles extraíbles/L)/ vino blanco enriquecido ( 1425 mg polifenoles extraíbles/L)	Reducción colesterol total en los grupos suplementados con vino (en grupo con etanol, reducción no significativa). Aumento de Apo A1 en grupo con etanol, y aumento de ApoB en grupos con etanol y vino. Aumento capacidad antioxidante plasmática en grupo con vino blanco enriquecido.

**Tabla 28** (continuación)

<u>Estudio</u>	<u>Diseño</u>	<u>Efecto</u>
Goñi & Serrano, 2005	Sujetos: 20 ratas Duración: 5 semanas Sup: 50 mg/kg peso y día de FAU (4,72% polifenoles extraíbles) o celulosa	Aumento significativo en el grupo FAU de polifenoles extraíbles, taninos condensados y capacidad antioxidante asociada a ambos (FRAP y ABTS) en contenidos cecales.
Falchi et al., 2006	Sujetos: ratas Duración: 30 días Sup: extracto de pulpa de uva (0,03-0,04 g polifenoles/g mf), extracto de piel de uva (0,18-0,32 g polifenoles/g mf), agua	La piel y la uva mostraron el mismo efecto cardioprotector y de neutralización del radical hidroxilo
Goñi et al., 2007	Sujetos: 120 pollos Duración: 3 semanas Sup: 200 mg/kg peso de vitamina E, 5 mg/kg peso orujo de uva tinta, 15 mg/kg peso orujo de uva tinta, 30 mg/kg peso orujo de uva tinta, control con 30 g/kg de celulosa	Aumento significativo de la capacidad antioxidante de las heces en el grupo suplementado con orujo de uva tinta y en el suplementado con vitamina E. Ausencia de cambios en la capacidad antioxidante plasmática. Descenso de la producción de MDA en pechuga y muslo tras una semana en refrigeración en el grupo suplementado con vitamina E y en el suplementado con 30 mg/kg orujo de uva tinta

**Tabla 28** (continuación)

<u>Estudio</u>	<u>Diseño</u>	<u>Efecto</u>
Pace-Asciak et al., 1996	Sujetos: 24 hombres sanos, Tratamientos con vino blanco, vino tinto y vino tinto enriquecido en resveratrol.	El vino blanco, pero no el tinto, redujo la agregación plaquetaria inducida por ADP. Ambos vinos redujeron la agregación plaquetaria inducida por trombina y redujeron la concentración plasmática de tromboxano B2. El zumo de uva enriquecido en resveratrol redujo la agregación plaquetaria inducida por trombina.
Miyagi et al., 1997	Sujetos: 20 varones sanos Duración: estudio agudo, medida 1 y 2hs después de la ingesta Sup: 300 mL vino tinto/450 mL vino blanco/ 750 mL cerveza/ 300 mL zumo de uva	El zumo de uva no inhibió la oxidación de LDLs (método TBARS) 1 y 2hs después de la ingesta, mientras que el vino tinto sí lo hizo.
Serafín, Maiani & Ferro Luzzi, 1998	Sujetos: 10 voluntarios sanos Duración: estudio agudo Dieta: los sujetos tomaron en ayunas 113 mL de vino tinto desalcoholizado, 1 semana después la misma cantidad de vino blanco y una semana después de agua	A los 50 minutos de la ingesta, hubo un aumento significativo de la capacidad antioxidante plasmática (método TRAP) y polifenoles en los sujetos que tomaron el vino tinto desalcoholizado.
Djousse et al., 1999	Sujetos: 13 voluntarios sanos Se midieron los efectos 2,4 y 6 hs después de una comida rica en grasas acompañada de un refresco, y una semana después de la misma comida acompañada de 3 mL vino tinto/kg de peso.	Aumento de triglicéridos y VLDLs tras la comida con vino, aunque no significativos. Ningún efecto en la función vasomotora tras la ingesta de vino.

**Tabla 29.** Resumen de estudios *in vivo* en humanos de los últimos diez años suplementando con uva, vino o subproductos de la elaboración del vino.

<u>Estudio</u>	<u>Diseño</u>	<u>Efecto</u>
Keevil et al., 2000	Sujetos: 10 voluntarios sanos Duración: 1 semana tomando cada uno de los Productos, con una semana de lavado entre medias Dieta: zumo de uva/ pomelo/ naranja, 5-7,5 mL por kg de peso y día.	El zumo de uva redujo en un 77% la agregación plaquetaria ex vivo, mientras que no hubo cambios significativos tras la ingesta de zumo de naranja o de pomelo.
Young et al., 2000	Sujetos: 15 voluntarios sanos Duración: 7 días + 7 días lavado o 7 días lavado + 7 días Sup: Dieta baja en flavonoides con 600 mg/día extracto de piel de uva con 5% de polifenoles extraíbles	Ligero aumento en MDA por seguir la dieta baja en flavonoides. Ausencia efecto en enzimas antioxidantes. Ligero descenso en oxidación proteínas.
O'Byrne et al., 2002	Sujetos: 36 personas sanas Duración: 2 semanas lavado inicial + 2 semanas Sup: 10 mL/kg peso día zumo de uva concentrado o 400 IU RR $\alpha$ -tocoferol	Aumento en ambos grupos de capacidad antioxidante plasmática (ORAC) y reducción oxidación LDLs. En grupo con zumo de uva, reducción grupos carbonilo oxidados. No variación perfil lipídico ni isoprostanos en orina.
Simonetti et al., 2002	Sujetos: 10 voluntarios sanos Duración: 30 días Sup: 280 mg/día de cápsulas con procianidinas de semillas de uva	Ningún efecto significativo en capacidad antioxidante plasmática (método TRAP) ni $\alpha$ -tocoferol plasmático. Aumento significativo $\alpha$ -tocoferol en eritrocitos. Reducción de daño oxidativo a ADN.
Estruch et al., 2004	Sujetos: 40 voluntarios sanos Duración: 1 semana lavado + 4 semanas intervención + 1 semana lavado + 4 semanas intervención Sup: 320 mL/día de vino tinto o 100 mL/día de ginebra	El vino tinto mostró efectos en la reducción de la expresión en monocitos de LFA-1, MaC-1, VLA-4 y en los niveles de proteína C. Ambas intervenciones redujeron IL1- $\alpha$ y el fibrinógeno.

Tabla 29 (continuación)

<u>Estudio</u>	<u>Diseño</u>	<u>Efecto</u>
Ward et al., 2005	Sujetos: personas hipertensas Duración: 3 semanas lavado inicial + 6 semanas Sup: polifenoles se semilla de uva tinta (1000 mg/día), Vitamina C, ambos o ninguno	La vitamina C redujo la presión arterial, pero los polifenoles no, y la combinación de ambos la aumento. No se observaron efectos en isoprostanos en plasma, LDLs oxidadas o tocoferoles plasmáticos.
Yem et al., 2005	Sujetos: mujeres pre y post-menopáusicas Duración: 4 semanas + 3 lavado + 4 semanas Sup: 36 g/día uvas tintas liofilizadas (3,4% fibra y 5,8% polifenoles extraíbles), o placebo	Bajada triglicéridos, apo B, isoprostanos en orina, TNF- $\alpha$ en el grupo experimental. No efecto en LDLs oxidadas ni proteína C reactiva.
Avellone et al., 2006	Sujetos: 48 personas no consumidores habituales de vino Duración: 4 semanas Sup: 250 mL diarios de vino tinto	Descenso significativo en la ratio LDL/HDL, fibrinógeno, proteína C reactiva, anticuerpos de LDLs oxidadas. Aumento en colesterol HDL, apoA1, capacidad antioxidante plasmática (ABTS)
Castilla et al., 2006	Sujetos: 38 personas hemodializadas y 15 sanas. Duración: 2 semanas + medidas a las 4 semanas y a los 6 meses Sup: 100 mL/día zumo de uva concentrado (600 mg polifenoles extraíbles/día)	Descenso significativo de colesterol LDL y Apo B y en ratio HDL/LDL. Aumento colesterol HDL y ApoA1, capacidad antioxidante plasmática (ABTS) y vitamina E plasmática tras estandarizar concentraciones de colesterol. No efecto en vitamina C, CRP, ICAM1, V-CAM1
Pignatelli et al., 2006	Sujetos: 20 personas sanas Duración: 1 semana lavado inicial + 2 semanas Sup: 300 mL/día vino tinto (1,25 g polifenoles extraíbles/L) o vino blanco (0,18 g pps extraíbles/L)	Descenso isoprostanos en orina y aumento capacidad antioxidante plasmática en los dos grupos, especialmente en los que tomaron vino tinto. No efecto en el perfil lipídico.

Tabla 29. (continuación)

Por lo que se refiere a la fibra dietética de distintos orígenes, y en particular a la fibra insoluble, la más abundante en la Fibra Antioxidante de Uva, la cantidad de estudios *in vivo* realizados durante las últimas décadas con alimentos ricos en fibra insoluble o enriquecidos en la misma, es ingente. Así mismo, también se han desarrollado algunos trabajos sobre los efectos de algunos purificados de fibra, ricos en fibra insoluble, que podrían tener ciertas características comunes con la Fibra Antioxidante de Uva, aunque en algunos casos no llevarían asociados compuestos antioxidantes. Algunos ensayos realizados en los últimos años con productos de este tipo se resumen en la **Tabla 30**.

Por tanto, éste sería el primer estudio en el que se tendrían en cuenta de manera conjunta los efectos beneficiosos que la fibra y los antioxidantes de las uvas tintas pueden tener en parámetros de riesgo cardiovascular en una población con distintos niveles de colesterol y durante un tiempo más largo (3,5 meses) que el empleado habitualmente en los estudios sobre antioxidantes de uva y/o vino (Simonetti et al., 2002; Estruch et al., 2004; Ward et al., 2005; Avellone et al., 2006; Castilla et al., 2006)

Así mismo, las cantidades proporcionadas (7,5 g/día) podrían ser incorporadas fácilmente a la dieta habitual. Con este objetivo, se examinaron tanto parámetros relacionados de forma tradicional con el riesgo cardiovascular como parámetros indicativos del status antioxidante. Así mismo, y tras experiencias anteriores en las que se observó la necesidad de tener un conocimiento sobre la dieta que siguieron los sujetos a lo largo del ensayo, se realizaron a lo largo del mismo recordatorios de 24 hs para después poder analizar posibles variaciones en la dieta, interacciones entre ésta y la Fibra Antioxidante de Uva, etc. De la misma manera, se prolongó el tiempo del ensayo y se aumentó la cantidad de marcadores de status antioxidante y estrés oxidativo que fueron determinados, en relación a experiencias anteriores.

<u>Estudio</u>	<u>Diseño</u>	<u>Efecto</u>
Pérez-Olleros et al., 1999b	Sujetos: 42 ratas Duración: 18 días Sup: La mitad de las ratas tenían dieta sin colesterol, y la otra mitad con colesterol. En cada grupo, ratas con celulosa, psyllium y fibra de algarroba.	Menor aumento de colesterol en las ratas que tomaban la dieta con colesterol y fibra de algarroba que en las que tomaban la dieta con colesterol y con celulosa o con colesterol y psyllium.
Pérez-Olleros et al., 1999a	Sujetos: 40 ratas Duración: 28 días Sup: Diseño similar al anterior, aunque sin psyllium	Menor aumento de colesterol en las ratas que tomaban la dieta con colesterol y fibra de algarroba que en las que tomaban la dieta con colesterol y con celulosa.
Jacobs et al., 2002	Sujetos: 1208 personas a las que se les había eliminado un adenoma colorrectal en los 3 meses anteriores. Duración: 2 años Sup: 2 d/día o 13,5 g/día de fibra de salvado de trigo	No se observó una reducción en la incidencia de adenoma colorrectal, ni considerando la ingesta del suplemento, ni la ingesta total de fibra dietética.
Chen et al., 2004	Sujetos: 247 personas a las que se les había eliminado un adenoma colorrectal en los 3 meses anteriores. Duración: 2 años Sup: 2 d/día o 13,5 g/día de fibra de salvado de trigo	La fibra de salvado de trigo no provocó ninguna modificación en la pérdida de densidad mineral
Castillejo et al., 2006	Sujetos: 48 niños de 3-20 años con diarrea crónica. Duración: 4 semanas Sup: producto a partir de semillas de caco rico en fibra dietética/ placebo	Tendencia no significativa a tiempos de tránsito menores en el grupo con fibra, y significativa en los niños con tránsito intestinal completo por encima del percentil 50. Reducción significativa de las deposiciones duras en el grupo con fibra.
Lecumberri et al., 2007	Sujetos: 32 ratas Duración: 3 semanas Sup: La mitad de las ratas tenían dieta sin colesterol, y la otra mitad con colesterol. En cada grupo, ratas con celulosa y con fibra de cacao	Menor aumento de colesterol en las ratas que tomaban la dieta con colesterol y fibra de cacao que en las que tomaban la dieta con colesterol y con celulosa. Niveles similares de triglicéridos en las ratas con dieta sin colesterol y en las ratas con dietas con colesterol y fibra de cacao.

**Tabla 30.** Resumen de estudios *in vivo* suplementando con distintas fibras insolubles

### **3.7.1 Evaluación dietética**

La **Tabla 31** muestra la evaluación a lo largo del ensayo en todos los parámetros dietéticos analizados, tras procesar los recordatorios de 24 hs con el programa informático DIAL.

Se puede observar que, por un lado, se analizaron parámetros globales de la dieta, como la evolución de la ingesta calórica que permite estudiar si debido al consumo de Fibra Antioxidante de Uva se produce una saciedad desde el punto de vista químico (quimiorreceptores en el estómago), y al considerar la porción comestible ingerida se estudia la saciedad desde un punto de vista físico. Así mismo, se analizó el aporte en raciones de los distintos grupos de alimentos a la dieta, la evolución en la ingesta de macro y micronutrientes y la evolución en la ingesta de compuestos concretos, como ciertos fitosteroles, cafeína o alcohol.

En el grupo control, entre el tiempo inicial y el final, sólo hubo un aumento significativo en la ingesta de vitamina D (de 1,87 a 2,92 µg/ día) y de carotenoides ( de 1835 a 2469 µg/ día), así como un descenso en la ingesta de cafeína (de 73,05 a 49,34 mg/día) Así mismo, entre la medida media y la final, se produjo un aumento significativo en las raciones de frutas ingeridas, lo que dio lugar a aumentos significativos en las ingestas de hidratos de carbono, azúcares sencillos, fibra insoluble y fibra total, así como una reducción en la ingesta de lípidos. No obstante, como entre la medida inicial y la final hubo un ligero descenso en la ingesta de frutas, entre el principio y el final no hubo cambios significativos en estos parámetros.

Por lo que se refiere al grupo experimental, se observó un aumento en la ingesta total, que correspondió a aumentos significativos en la ingesta tanto de sólidos como de líquidos. Sin embargo, esto no se vio acompañado de cambios en la ingesta calórica, por lo que se consumieron alimentos con menor contenido calórico. Por lo que se refiere a los grupos de alimentos, se produjo una reducción del consumo de lácteos ( $2,2 \pm 0,9$  a  $1,8 \pm 0,6$  raciones/ día). Así mismo, tuvieron lugar aumentos significativos en la ingesta de hidratos de carbono ( $185 \pm 50$  a  $200 \pm 37$  g/día), azúcares sencillos ( $94 \pm 29$  a  $108 \pm 24$  g/día), sacarosa ( $26 \pm 12$  a  $32 \pm 10$  g/día) y alcohol (de  $6,4 \pm 12,1$  a  $10,7 \pm 13,7$  g/día) y descenso significativo de ácidos grasos saturados ( $31 \pm 10$  a  $27 \pm 9$  g/día). Por otro lado, se produjo un aumento significativo de la ingesta de fibra dietética, tanto soluble como insoluble, tras la incorporación de la FAU a la dieta.



La evaluación dietética también se aplicó al grupo experimental tras dividirlo en función del sexo, nivel de colesterol inicial y % de grasa inicial. Tras aplicar estas divisiones, la única modificación en la dieta que se observó como tendencia clara fue el aumento en la ingesta de glúcidos totales, en concreto, de azúcares sencillos y, a su vez, de sacarosa- en cada uno de los tres subgrupos analizados tuvo lugar un aumento significativo en al menos dos de estos parámetros. Así mismo, en todos los subgrupos (salvo en el de hombres) se produjo un aumento significativo de la ingesta de líquidos; la ingesta de sólidos, aunque aumentaba en todos, no aparecía en ninguno de los subgrupos como significativa.

	grupo FAU			grupo control		
	tiempo 0	2 meses	3,5 meses	tiempo 0	2 meses	3,5 meses
Ingesta calórica (kcal/día)	1960 ± 428 <sup>a</sup>	1984 ± 409 <sup>a</sup>	1983 ± 352 <sup>a</sup>	2530 ± 1066 <sup>a</sup>	2264 ± 495 <sup>a</sup>	2441 ± 782 <sup>a</sup>
Ingesta total (g/día)	2191 ± 526 <sup>a</sup>	2468 ± 604 <sup>b</sup>	2468 ± 490 <sup>b</sup>	2900 ± 722 <sup>a</sup>	2716 ± 906 <sup>a</sup>	3128 ± 1120 <sup>a</sup>
Líquidos (mL/día)	945 ± 400 <sup>a</sup>	1192 ± 579 <sup>b</sup>	1287 ± 576 <sup>b</sup>	1401 ± 803 <sup>a</sup>	1420 ± 834 <sup>a</sup>	1707 ± 986 <sup>a</sup>
Sólidos (g/día)	1246 ± 392 <sup>a</sup>	1268 ± 405 <sup>a</sup>	1361 ± 396 <sup>b</sup>	1498 ± 601 <sup>a</sup>	1295 ± 393 <sup>a</sup>	1421 ± 283 <sup>a</sup>
Raciones/día cereales y legumbres	3,7 ± 1,6 <sup>a</sup>	3,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	3,9 ± 1,3 <sup>a</sup>	4 ± 2,2 <sup>a</sup>	4,1 ± 2,4 <sup>a</sup>	4,4 ± 2,3 <sup>a</sup>
Raciones/día verduras	3,2 ± 2 <sup>a</sup>	3,3 ± 1,8 <sup>a</sup>	3,3 ± 1,5 <sup>a</sup>	2,6 ± 1,5 <sup>a</sup>	2,9 ± 2,3 <sup>a</sup>	2,6 ± 1,7 <sup>a</sup>
Raciones/día frutas	1,9 ± 1,5 <sup>a</sup>	1,8 ± 1 <sup>a</sup>	1,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	2,3 ± 2,1 <sup>a</sup>	1,6 ± 1,3 <sup>b</sup>	2,7 ± 1,6 <sup>a</sup>
Raciones/día lácteos	2,2 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,6 <sup>b</sup>	3,5 ± 2,3 <sup>a</sup>	2,9 ± 1 <sup>a</sup>	2,7 ± 1,2 <sup>a</sup>
Raciones/día carnes y pescados	3,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	3,8 ± 1,7 <sup>b</sup>	3,7 ± 1,7 <sup>b</sup>	3 ± 1,8 <sup>a</sup>	3 ± 1,8 <sup>a</sup>	2,9 ± 1 <sup>a</sup>
Glúcidos (g/día)	185 ± 50 <sup>a</sup>	199 ± 53 <sup>b</sup>	200 ± 37 <sup>b</sup>	287 ± 121 <sup>a</sup>	235 ± 97 <sup>b</sup>	275 ± 117 <sup>a</sup>
Azúcares sencillos (g/día)	94 ± 29 <sup>a</sup>	103 ± 27 <sup>b</sup>	108 ± 24 <sup>b</sup>	164 ± 71 <sup>a</sup>	126 ± 47 <sup>b</sup>	160 ± 63 <sup>a</sup>
Sacarosa (g/día)	26 ± 12 <sup>a</sup>	32 ± 12 <sup>b</sup>	32 ± 10 <sup>b</sup>	57 ± 27 <sup>a</sup>	36 ± 16 <sup>a</sup>	60 ± 31 <sup>a</sup>
Fibra dietética soluble (g/día)	3,8 ± 2,1 <sup>a</sup>	4,6 ± 2,9 <sup>a</sup>	4,9 ± 3,7 <sup>b</sup>	3 ± 1,6 <sup>a</sup>	3,1 ± 1,3 <sup>a</sup>	3,3 ± 1 <sup>a</sup>
Fibra dietética insoluble (g/día)	7,5 ± 4,8 <sup>a</sup>	11,4 ± 8,2 <sup>b</sup>	10,7 ± 7,7 <sup>b</sup>	6 ± 3,1 <sup>a</sup>	5,5 ± 2,4 <sup>b</sup>	6,5 ± 2,5 <sup>a</sup>
Fibra dietética total (g/día)	11,4 ± 6,8 <sup>a</sup>	16 ± 5,5 <sup>b</sup>	16 ± 3 <sup>b</sup>	9 ± 5 <sup>a</sup>	8,7 ± 3,3 <sup>b</sup>	9,8 ± 3,3 <sup>a</sup>
Lípidos (g/día)	90,2 ± 23,3 <sup>a</sup>	85 ± 28 <sup>a</sup>	82 ± 22 <sup>a</sup>	108 ± 44 <sup>a</sup>	93 ± 19 <sup>b</sup>	95 ± 24 <sup>a</sup>
Ácidos grasos saturados (g/día)	31,6 ± 9,8 <sup>a</sup>	29 ± 10 <sup>a</sup>	27 ± 9 <sup>b</sup>	42 ± 20 <sup>a</sup>	34 ± 7 <sup>a</sup>	33 ± 9 <sup>a</sup>
Ácidos grasos moninsaturados (g/día)	38,1 ± 11,4 <sup>a</sup>	37 ± 13,3 <sup>a</sup>	35,9 ± 10,6 <sup>a</sup>	43,6 ± 15 <sup>a</sup>	37,2 ± 8,2 <sup>a</sup>	41,5 ± 13,7 <sup>a</sup>
Ácidos grasos poliinsaturados (g/día)	12,7 ± 4,5 <sup>a</sup>	12,3 ± 4 <sup>a</sup>	11,6 ± 3,7 <sup>a</sup>	15,3 ± 10,2 <sup>a</sup>	14 ± 4,5 <sup>a</sup>	12,5 ± 3,8 <sup>a</sup>

	grupo FAU			grupo control		
	tiempo 0	2 meses	3,5 meses	tiempo 0	2 meses	3,5 meses
Colesterol (mg/día)	319 ± 126 <sup>a</sup>	334 ± 136 <sup>a</sup>	303 ± 109 <sup>a</sup>	277 ± 98 <sup>a</sup>	362 ± 132 <sup>a</sup>	369 ± 207 <sup>a</sup>
Proteína (g/día)	80 ± 19 <sup>a</sup>	83 ± 26 <sup>a</sup>	82 ± 23 <sup>a</sup>	89 ± 25 <sup>a</sup>	85 ± 14 <sup>a</sup>	84 ± 20 <sup>a</sup>
Lisina/Arginina	1,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,3 <sup>a</sup>
Vitamina B1 (mg/día)	1,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>a</sup>
Vitamina B2 (mg/día)	1,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	2 ± 0,4 <sup>a</sup>	2 ± 0,4 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,5 <sup>a</sup>
Niacina (mg/día)	32,6 ± 1,5 <sup>a</sup>	35,1 ± 10,4 <sup>a</sup>	33,6 ± 7,2 <sup>a</sup>	34,2 ± 11,2 <sup>a</sup>	35 ± 4,8 <sup>a</sup>	34,4 ± 6,3 <sup>a</sup>
Vitamina B6 (mg/día)	2 ± 0,65 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	2 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	2 ± 0,55 <sup>a</sup>
Vitamina B12 (mg/día)	5,7 ± 4 <sup>a</sup>	6,7 ± 4,6 <sup>a</sup>	6,1 ± 4,9 <sup>a</sup>	5,9 ± 3,2 <sup>a</sup>	5,9 ± 1,9 <sup>a</sup>	5,4 ± 2,6 <sup>a</sup>
Vitamina C (mg/día)	172 ± 190 <sup>a</sup>	155 ± 59 <sup>a</sup>	150 ± 91 <sup>a</sup>	164 ± 87 <sup>a</sup>	267 ± 473 <sup>a</sup>	173 ± 73 <sup>a</sup>
Vitamina A (µg/día)	736 ± 330 <sup>a</sup>	1136 ± 1623 <sup>a</sup>	829 ± 346 <sup>a</sup>	840 ± 221 <sup>a</sup>	746 ± 209 <sup>a</sup>	800 ± 172 <sup>a</sup>
Vitamina D (µg/día)	2,4 ± 2,5 <sup>a</sup>	2,8 ± 2,2 <sup>a</sup>	4,8 ± 7,4 <sup>a</sup>	1,9 ± 1 <sup>a</sup>	3,4 ± 1,3 <sup>b</sup>	2,9 ± 1,1 <sup>b</sup>
Vitamina E (mg/día)	8,9 ± 4,3 <sup>a</sup>	8,4 ± 2,9 <sup>a</sup>	8,8 ± 2,8 <sup>a</sup>	8 ± 2,2 <sup>a</sup>	8,9 ± 4,1 <sup>a</sup>	8,9 ± 2,3 <sup>a</sup>
Vitamina K (µg/día)	126 ± 82 <sup>a</sup>	151 ± 76 <sup>a</sup>	138 ± 84 <sup>a</sup>	86 ± 48 <sup>a</sup>	101 ± 53 <sup>a</sup>	99 ± 52 <sup>a</sup>
Pantoténico (mg/día)	5,3 ± 1,4 <sup>a</sup>	5,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	5 ± 0,9 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	5,3 ± 1,6 <sup>a</sup>	5,4 ± 1,2 <sup>a</sup>
Ácido fólico (µg/día)	297 ± 144 <sup>a</sup>	302 ± 108 <sup>a</sup>	273 ± 75 <sup>a</sup>	268 ± 34 <sup>a</sup>	332 ± 179 <sup>a</sup>	263 ± 68 <sup>a</sup>
Calcio (mg/día)	925 ± 293 <sup>a</sup>	834 ± 187 <sup>a</sup>	823 ± 177 <sup>a</sup>	1193 ± 441 <sup>a</sup>	916 ± 416 <sup>a</sup>	1031 ± 312 <sup>a</sup>
Hierro (mg/día)	13,5 ± 4 <sup>a</sup>	14,5 ± 4,6 <sup>a</sup>	13,8 ± 2,7 <sup>a</sup>	12,8 ± 13,1 <sup>a</sup>	12,3 ± 2,1 <sup>a</sup>	11,7 ± 3 <sup>a</sup>
Yodo (µg/día)	102 ± 42 <sup>a</sup>	104 ± 41 <sup>a</sup>	104 ± 32 <sup>a</sup>	118 ± 41 <sup>a</sup>	120 ± 48 <sup>a</sup>	118 ± 35 <sup>a</sup>
Magnesio (mg/día)	281 ± 85 <sup>a</sup>	311 ± 90 <sup>a</sup>	293 ± 59 <sup>a</sup>	312 ± 58 <sup>a</sup>	291 ± 62 <sup>a</sup>	285 ± 60 <sup>a</sup>

	grupo FAU			grupo control		
	tiempo 0	2 meses	3,5 meses	tiempo 0	2 meses	3,5 meses
Zinc (mg/día)	$9 \pm 2^a$	$9 \pm 2^a$	$9 \pm 2^a$	$10,4 \pm 2,7^a$	$10,1 \pm 2,2^a$	$9,4 \pm 3,2^a$
Sodio (mg/día)	$2309 \pm 786^a$	$2337 \pm 973^a$	$2253 \pm 760^a$	$2770 \pm 1545^a$	$2450 \pm 437^a$	$2164 \pm 897^a$
Potasio (mg/día)	$2952 \pm 817^a$	$3158 \pm 820^a$	$3065 \pm 484^a$	$3136 \pm 4392^a$	$2884 \pm 667^a$	$2795 \pm 734^a$
Fósforo (mg/día)	$1415 \pm 308^a$	$1414 \pm 326^a$	$1369 \pm 245^a$	$1765 \pm 523^a$	$1776 \pm 434^a$	$1584 \pm 429^a$
Selenio (mg/día)	$98 \pm 38^a$	$108 \pm 49^a$	$101 \pm 28^a$	$114 \pm 51^a$	$110 \pm 38^a$	$102 \pm 31^a$
Cromo ( $\mu$ g/día)	$44 \pm 23^a$	$50 \pm 29^a$	$46 \pm 18^a$	$48 \pm 36^a$	$31 \pm 14^a$	$37 \pm 17^a$
Cloro (mg/día)	$1846 \pm 736^a$	$1883 \pm 731^a$	$1831 \pm 461^a$	$1695 \pm 396^a$	$1640 \pm 450^a$	$1718 \pm 511^a$
Calidad del hierro (%)	$3,7 \pm 1,9^a$	$4,2 \pm 1,7^a$	$7,3 \pm 16^a$	$3,9 \pm 2,4^a$	$3,1 \pm 1^a$	$3 \pm 0,8^a$
$\omega$ 3 (g/día)	$0,24 \pm 0,14^a$	$0,25 \pm 0,11^a$	$0,30 \pm 0,24^a$	$0,20 \pm 0,09^a$	$0,25 \pm 0,1^a$	$0,26 \pm 0,16^a$
$\beta$ -sitosterol (mg/día)	$28 \pm 22^a$	$24 \pm 13^a$	$26,6 \pm 10,4^a$	$31,9 \pm 13,6^a$	$22,1 \pm 3,1^a$	$27,4 \pm 2,3^a$
Campesterol (mg/día)	$3,2 \pm 2,9^a$	$2,9 \pm 1,7^a$	$3,2 \pm 1,7^a$	$5,1 \pm 1^a$	$2,9 \pm 0,03^a$	$3,6 \pm 0,6^a$
Estigmasterol (mg/día)	$4,9 \pm 3,9^a$	$4,9 \pm 2,5^a$	$6 \pm 2,5^a$	$6 \pm 2^a$	$5,3 \pm 0,4^a$	$5,5 \pm 0,4^a$
Carotenos (mg/día)	$2045 \pm 1550^a$	$2456 \pm 1727^a$	$2681 \pm 1445^a$	$1835 \pm 1281^a$	$1969 \pm 700^a$	$2469 \pm 470^b$
Cafeína (mg/día)	$37,4 \pm 42,9^a$	$35,7 \pm 36,7^a$	$38 \pm 45^a$	$74 \pm 14^a$	$40 \pm 2,9^b$	$49 \pm 29^b$
Alcohol (g/día)	$6,4 \pm 12,1^a$	$9,7 \pm 12,5^b$	$10,7 \pm 13,7^b$	$12,8 \pm 17^a$	$5 \pm 6,2^a$	$13,5 \pm 10,5^a$

**Tabla 31.** Evaluación dietética en el grupo FAU y en el grupo control

### **3.7.2 Estado nutricional**

La suplementación con Fibra Antioxidante de Uva no produjo ningún daño hepático, como demuestra la ausencia de variaciones significativas en los valores de las distintas enzimas hepáticas a lo largo del estudio, ni tampoco en los niveles de creatinina plasmática.

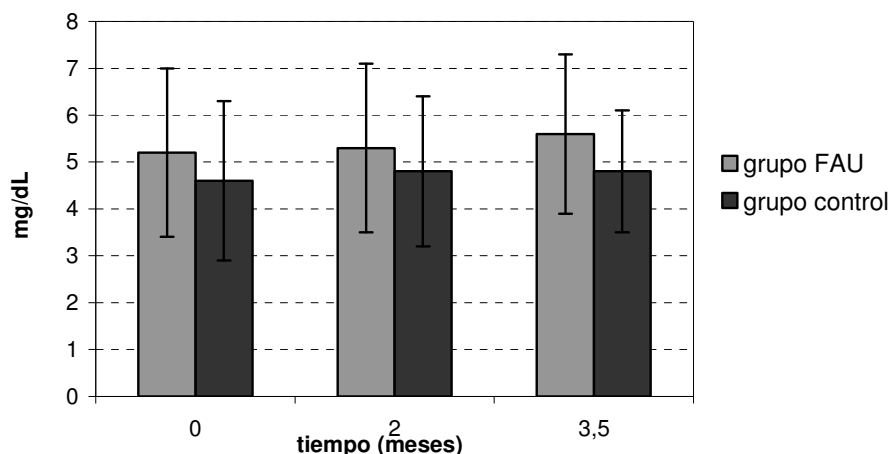
Tampoco se observó una reducción en los niveles de hematocrito ni de proteína plasmática en los sujetos que tomaron la FAU, por lo que no parece que este producto pueda producir algún tipo de carencia nutricional reflejada en estos marcadores.

Respecto a las concentraciones de leucocitos y linfocitos, salvo algún episodio puntual de gastroenteritis (en cuyo caso, los datos correspondientes a esos análisis se desecharon para la estadística), no se encontró ninguna variación significativa.

Por otro lado, es ampliamente conocida la capacidad, tanto de la fibra dietética como de los polifenoles, de quelar ciertos metales e iones. Por esta razón, se determinaron los niveles plasmáticos de distintos minerales, con el objetivo de determinar si la FAU estaba produciendo alguna alteración en su metabolización. No se encontraron cambios significativos en los niveles de ninguno de estos elementos, lo que concuerda con un ensayo realizado en hámsteres en el que, tras la suplementación con varios productos ricos en polifenoles, no se observaron cambios en los niveles plasmáticos de Fe ni Cu (Auger et al., 2005). Sin embargo, es necesario indicar que en el grupo experimental se observó un descenso, pequeño pero significativo, en los niveles de hemoglobina tras la ingesta de la FAU (de  $14,4 \pm 1,4$  g/dL a  $14,2 \pm 1,2$  g/dL) que no tuvo lugar en el grupo control. No hemos encontrado ninguna referencia al respecto en ninguno de los trabajos revisados sobre suplementación con fibra y/o antioxidantes, pero las consecuencias fisiológicas de este descenso en el sentido de un posible déficit de Fe a medio plazo deberían ser consideradas. Ya se señaló previamente que, en el estudio de suplementación a fumadores durante un mes con Fibra Antioxidante de Uva, no hubo ningún efecto adverso en el metabolismo del hierro, aunque puede que éste aparezca tras una ingesta más prolongada.

A lo largo del estudio también se observó un aumento en la concentración plasmática de ácido úrico que, aunque tuvo lugar tanto en el grupo experimental como

en el grupo control (**Figura 32**), sólo fue significativa en el grupo experimental. No obstante, se pasaría de un valor inicial de  $5,2 \pm 1,8$  a uno final de  $5,6 \pm 1,7$  mg/dL, lo que en individuos sanos no tendría repercusiones sanitarias. En cualquier caso, éste sería otro factor a tener en cuenta a la hora de decidir en qué segmentos de la población se podría recomendar el consumo de un producto de estas características.



**Figura 32.** Evolución del ácido úrico plasmático en el grupo experimental y en el grupo control

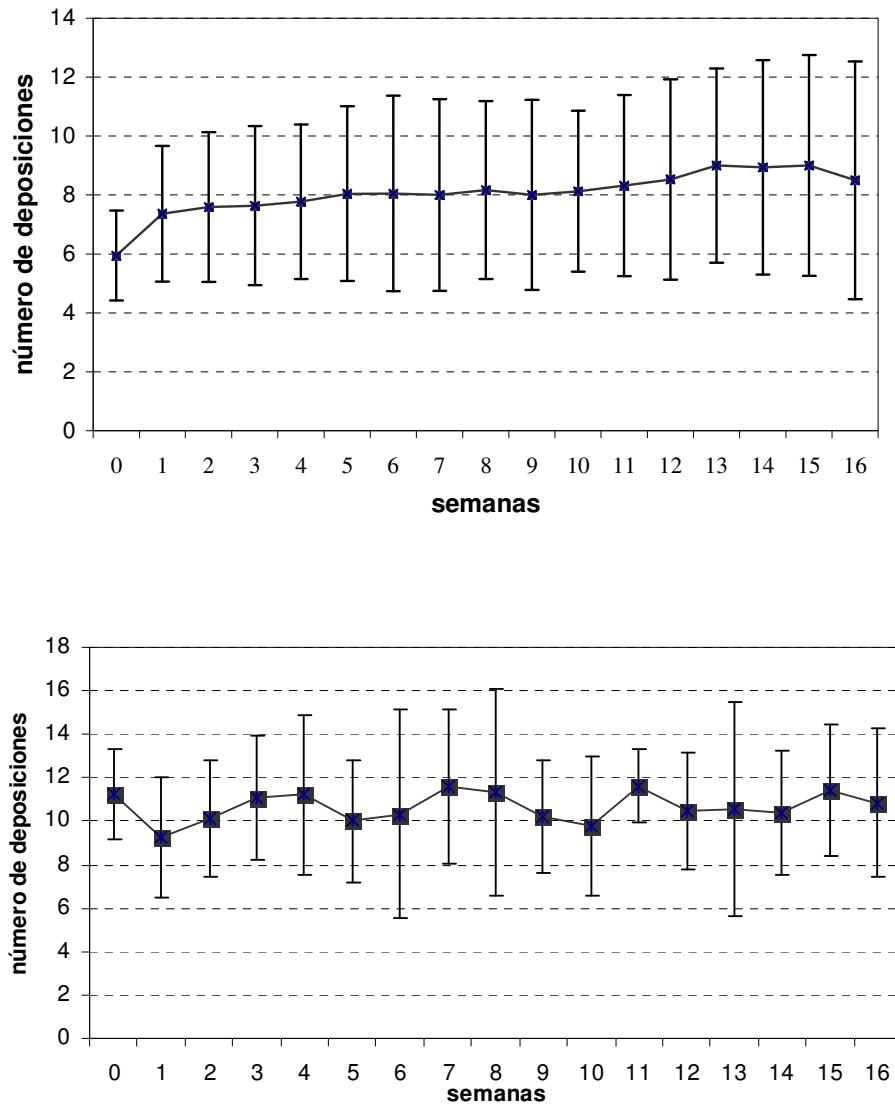
Respecto a las posibles causas para esta subida del ácido úrico, se podría considerar que, dado que el producto incluía una gran cantidad de materia celular procedente de las levaduras responsables de la fermentación vínica, estos núcleos podrían haber supuesto un aporte considerable de ácido úrico. De hecho, el valor obtenido de contenido en proteína (11,08%), al provenir realmente de una medida de contenido en nitrógeno, podría enmascarar parte de este contenido en purinas. Mediante tratamientos tecnológicos se podría intentar reducir la posible presencia de estos compuestos.

Otra posible explicación de esta modificación en el valor del ácido úrico podría ser el hecho de que, como ya se ha comentado, a lo largo del ensayo se produjo un aumento significativo en el consumo de alcohol en los sujetos del grupo experimental (de  $6,4 \pm 12,1$  g/día a  $10,7 \pm 13,7$  g/día) y la relación entre estos dos parámetros es ampliamente conocida, dado que la degradación de etanol en el hepatocito lleva a un aumento del consumo de ATP y, por tanto, aumenta la producción de ácido úrico por la degradación de purinas (Lieber, 1991). Esto explicaría por qué este aumento en los

niveles plasmáticos de ácido úrico no tuvo lugar en el estudio en fumadores- aunque también se debe tener en cuenta que dicho estudio duró una tercera parte del actual, por lo que, si el aumento se debiera al elevado contenido en bases nitrogenadas de la Fibra Antioxidante de Uva, podría ser acumulativo y no habría dado tiempo a que se manifestara en el caso del estudio en fumadores, que duró un mes.

### **3.7.3 Tránsito intestinal**

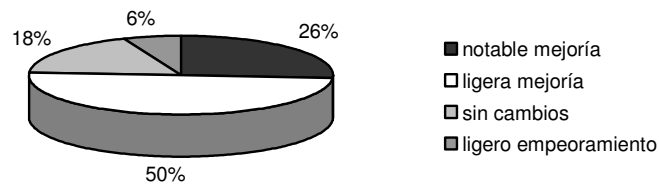
Es ampliamente conocido el efecto positivo de la fibra dietética en el tránsito gastrointestinal. En este caso, a pesar de la gran variación interindividual existente, la FAU también mostró un efecto regulador, aumentando el tránsito gastrointestinal en aquellas personas que, al comenzar el estudio, indicaron una media de 7 deposiciones o menos a la semana ( $p = 0,018$  al comparar el principio con el final del estudio) mientras que no tuvo un efecto en aquellas que, al comenzar, manifestaron tener una media de mas de 8 deposiciones a la semana ( $p = 0,805$  al comparar el principio con el final del estudio) (**Figura 33**) Ninguno de los voluntarios manifestó haber experimentado diarrea. Estos regulados coinciden, por ejemplo, con los efectos observados tras la ingesta de psyllium, en los que se ve tanto una mejora de situaciones de estreñimiento, como una prevención de episodios de diarrea (Washington et al., 1998)



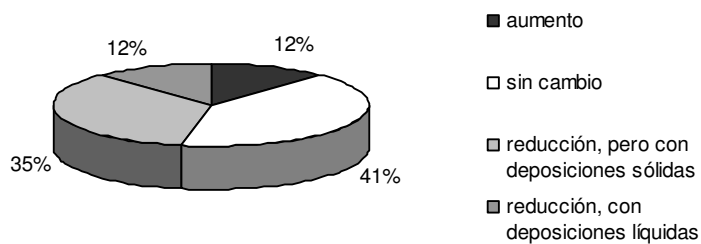
**Figura 33.** Evolución en el número semanal de deposiciones tras la ingesta de 7,5 g diarios de FAU en los voluntarios que inicialmente tenían una media de más de 7 deposiciones a la semana (arriba) y en los que inicialmente tenían una media de 8 deposiciones o más a la semana (abajo)

Además de preguntar semanalmente el número de deposiciones, en la encuesta realizada al finalizar el ensayo se incluyeron preguntas referentes a la percepción subjetiva de la evolución en el tránsito gastrointestinal tras la ingesta de la FAU. Las respuestas a dichas preguntas pueden verse en la **Figura 34**.

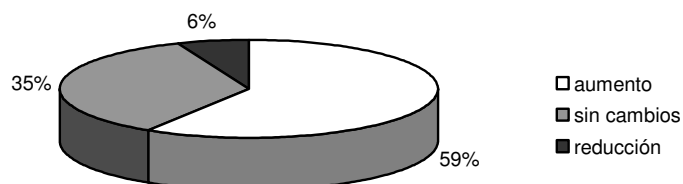




a) ¿Ha notado alguna mejoría en el tránsito gastrointestinal desde que empezó a tomar la Fibra Antioxidante de Uva?



b) ¿Ha notado cambios en la dureza y/o sequedad de las deposiciones?



c) ¿Ha notado cambios en la cantidad por deposición?

**Figura 34.** Resultados de la encuesta sobre percepción subjetiva de los efectos de la FAU en el tránsito gastrointestinal al finalizar el estudio

Se puede observar que la valoración global resultó positiva. Un 76% de los voluntarios respondió haber notado una ligera o notable mejoría en el tránsito gastrointestinal, más de un tercio reportó una reducción en la sequedad de las deposiciones, aunque manteniendo estas su estado sólido y más de la mitad notó un aumento en la cantidad por deposición. Previamente, ya se había observado cómo la fibra insoluble contribuye de manera clara al aumento de la masa fecal; en concreto, en un estudio en el que se comparaba salvado de trigo, rico en fibra insoluble, con pectina, constituyente de la fibra soluble, se observó como un gramo del primero suponía un aumento del volumen fecal en 5,7 g, mientras que un gramo de pectina la aumentaba en 1,3 g (Armstrong, Eastwood & Brydon, 1993)

No obstante, también hay que señalar que a un 11,8% de los sujetos del grupo experimental la FAU le originó deposiciones líquidas, lo que es un aspecto no deseado, y un 6% notó una reducción en el número de deposiciones.

### 3.7.4 Antropometría

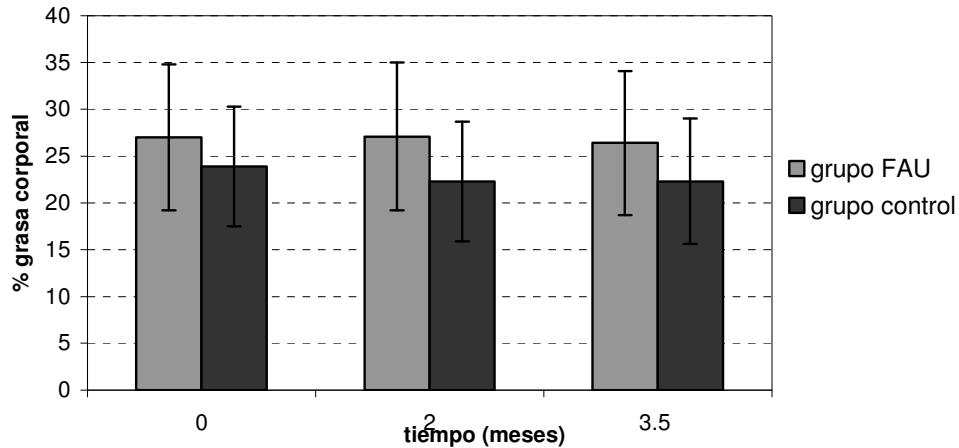
La **Tabla 32** muestra la evolución, en el grupo FAU y en el grupo control, del IMC a lo largo del estudio. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos grupos.

**Tabla 32.** Evolución en el IMC a lo largo del estudio en el grupo FAU y en el grupo control.

	tiempo 0	2 meses	3,5 meses
Grupo FAU	26,1 + 4,7 <sup>a</sup>	26,2 + 4,6 <sup>a</sup>	25,8 + 4,4 <sup>a</sup>
Grupo control	22,7 + 2,4 <sup>b</sup>	22,8 + 2,3 <sup>b</sup>	22,9 + 2,3 <sup>b</sup>

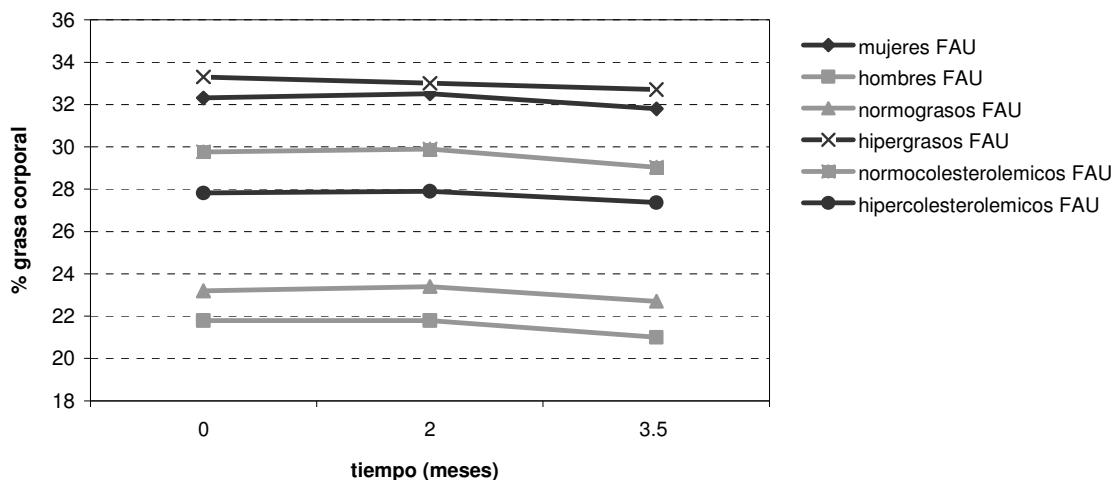
Distintos superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre grupos o entre tiempos

Igualmente, se determinó el % de grasa corporal a lo largo del estudio. Tanto en el grupo experimental como en el control se observó una tendencia a la reducción de la misma, pero no resultó significativa en ningún caso (**Figura 35**)



**Figura 35.** Evolución del % de grasa corporal en el grupo experimental y en el grupo control

Sin embargo, cuando el grupo experimental se dividió por sexos, se observó una reducción significativa del % de grasa corporal en las mujeres; en concreto, la bajada media fue de 400 g de grasa. De la misma manera, también se observó una bajada significativa del % de grasa corporal en los sujetos hipergrasos al compararlos con los normograsos (unos 700 g de grasa) (aunque en los normograsos también hubo una reducción del % de grasa corporal), y el % de grasa también se redujo en los normocolesterolémicos y en los hipercolesterolémicos (aunque sólo en los primeros de manera significativa, con una reducción media de 900 g). Todos estos resultados se pueden ver en la **Figura 36**.



**Figura 36.** Evolución del % de grasa corporal en el grupo FAU en función del sexo, % de grasa inicial y nivel de colesterol inicial

Tras el lavado de cuatro meses, hubo una recuperación de los valores iniciales de grasa corporal.

En el caso de los sujetos normocolesterolémicos se había observado una reducción significativa del IMC (de  $26,4 \pm 6,1$  a  $25,9 \pm 5,4$  kg/m<sup>2</sup>). Igualmente, el hecho de que en varios grupos se observara una reducción del % de grasa corporal podría indicar que, si el consumo de FAU se mantuviera durante un tiempo mas prolongado, podría haber también una reducción del IMC en otros grupos, un efecto interesante aunque el objetivo de la FAU no sea el actuar como producto adelgazante.

Por otro lado, se debe destacar que, como ya se ha comentado, estas modificaciones en la composición corporal no se debieron a modificaciones dietéticas en el sentido de reducir la ingesta calórica o de lípidos. Aunque en el grupo experimental se observó una reducción en la ingesta de ácidos grasos saturados, cuando éste se dividió de acuerdo con el sexo, nivel de colesterol inicial y % de grasa inicial, éste sólo se mantuvo como significativo en las mujeres.

### 3.7.5 Glucemia

Niveles elevados de glucemia pueden considerarse como un factor de riesgo cardiovascular. Así, en el síndrome metabólico, proceso en el que concurren distintas sintomatologías (hipertensión, obesidad, etc.) y donde existe un riesgo elevado de

enfermedad cardiovascular, la resistencia a la acción de la insulina y, posteriormente, la diabetes tipo II, son otras de las situaciones que pueden aparecer. Diversos estudios han descrito que la fibra dietética podría tener un efecto positivo en los niveles de glucemia y/o en la prevención de la aparición de diabetes (Salmeron et al., 1997; Chandalia et al., 2000)

De la misma manera, en un estudio con polifenoles de uva (Al-Awadi et al., 2004) en el que se suplementó con los mismos a ratas que seguían una dieta rica en fructosa, como modelo de no-obesidad, pero en el que aparece una resistencia a la acción de la insulina, se observó que, aunque esta suplementación no modificaba los valores de glucosa ni de insulina, sí reducía el índice HOMA: in, de resistencia a la acción de la insulina.

En este ensayo se produjo un descenso significativo de la glucemia tanto en el grupo experimental como en el control, por lo que *a priori* sería un efecto estacional y no se observaría un efecto beneficioso de la FAU en este sentido (**Tabla 33**)

**Tabla 33.** Evolución de la glucemia (mg/dL) en el grupo experimental y en el grupo control.

	tiempo 0	2 meses	3,5 meses
Grupo FAU	89 ± 10 <sup>a</sup>	91 ± 7 <sup>a</sup>	83 ± 9 <sup>b</sup>
Grupo control	85 ± 9 <sup>a</sup>	84 ± 8 <sup>a</sup>	78 ± 5 <sup>b</sup>

Distintos superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre grupos o entre tiempos.

No obstante, dado que la medida de la glucemia puede estar muy influenciada por la ingesta del día anterior, se determinó también la hemoglobina glicosilada, como marcador de la glucemia acumulada durante unas semanas antes. Los resultados de esta medida aparecen en la **Tabla 34**. No se observó ningún cambio significativo en ninguno de los dos grupos.

**Tabla 34.** Evolución de la hemoglobina glicosilada (en % sobre hemoglobina total) a lo largo del ensayo en el grupo experimental y en el grupo control.

	tiempo 0	2 meses	3,5 meses
Grupo FAU	4,93 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	4,66 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	5,01 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>
Grupo control	5,07 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	4,77 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	4,73 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>

Distintos superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre grupos o entre tiempos.

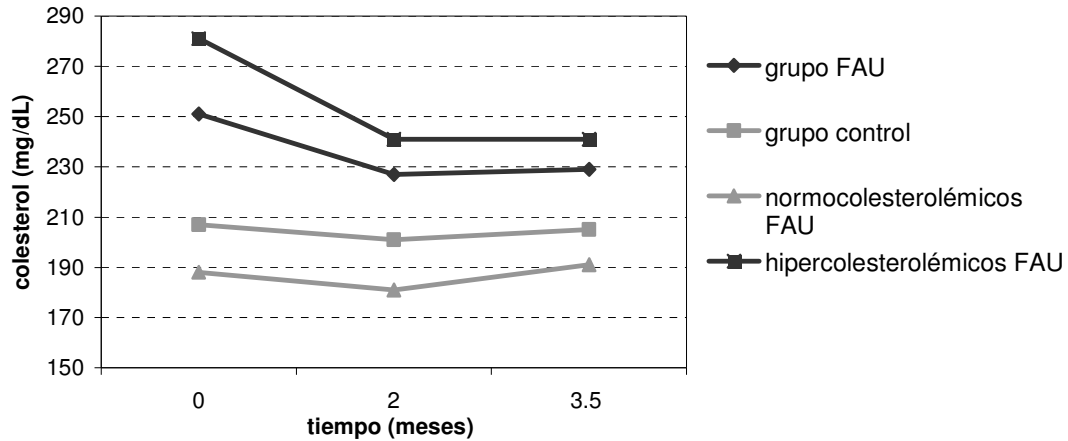
En este caso, también se dividió al grupo experimental en función del sexo, % de grasa inicial y % de colesterol inicial y se analizó la evolución de estos parámetros. Aunque en los voluntarios normograsos se observó una reducción significativa de la glucosa a lo largo del estudio, esto no tuvo una correspondencia con los niveles de hemoglobina glicosilada, una medida más robusta, así que no se consideró como relevante.

No obstante, se debe señalar que, como se indicó al analizar la evolución en las dietas a lo largo del ensayo, en el grupo experimental se produjo un aumento significativo a lo largo del ensayo en la ingesta de glúcidos, en concreto, de azúcares sencillos y, dentro de estos, de sacarosa. Esta tendencia, en al menos dos de los tres parámetros, se mantuvo para todas las divisiones que se hicieron del grupo completo. Por tanto, teniendo esto en cuenta, podríamos hablar de un posible efecto protector de la FAU ya que, a pesar de estas variaciones en la dieta, no se produjo un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa y tuvo lugar una reducción similar a la de los controles.

## 7.6

### 3.7.6 Perfil lipídico

La **Figura 37** muestra la evolución en los niveles de colesterol en el grupo experimental y en el grupo control a lo largo del ensayo. En primer lugar, es necesario indicar que a los voluntarios se les señaló la importancia de acudir al análisis con un ayuno de 12 hs, especialmente para determinar aspectos relacionados con el metabolismo lipídico. El cumplimiento de este aspecto se pudo comprobar por el hecho de que antes de cada análisis se les hacía una encuesta dietética del día anterior, observándose que los sujetos habían cenado temprano el día anterior para cumplir el periodo de ayuno.



**Figura 37.** Evolución del colesterol sérico a lo largo del ensayo en el grupo FAU, en el grupo control y en los sujetos normo e hipercolesterolémicos del grupo FAU

Por otro lado, respecto a los valores de partida de colesterol en la población estudiada, resulta llamativo el valor del grupo FAU, de  $250 \pm 64$  mg/dL en una población con una edad media, como se ha indicado, de 33 años de edad, frente a  $207 \pm 44$  mg/dL en el grupo control, con una edad media de 34 años de edad. Este valor tan elevado en el grupo experimental se debió a que un número elevado de los participantes, que al comenzar el estudio habían manifestado no ser hipercolesterolémicos, o tener unos niveles determinados de hipercolesterolemia, resultaron tener después unos valores mucho más elevados. Esto indica la necesidad de continuar fomentado medidas para la prevención de riesgos cardiovasculares, al encontrar niveles tan elevados de colesterol en una población tan joven y que, de hecho, desconocía en muchos casos esta situación. No obstante, no se excluyó a ningún sujeto, ante la previsión de abandonos a lo largo del ensayo en un estudio de esta duración- abandonos que, finalmente, no tuvieron lugar. Resulta interesante resaltar que en el grupo control también hubo sujetos que resultaron ser hipercolesterolémicos o tener valores más altos de colesterol que los que habían manifestado previamente, aunque esto no se produjo de una manera tan marcada como en el grupo experimental, lo que explica que el valor medio para este grupo fuera considerablemente más bajo.

Por lo que se refiere a la evolución a lo largo del ensayo, en el grupo experimental tuvo lugar una reducción significativa de los niveles de colesterol. Sin embargo, cuando este grupo se dividió entre los sujetos que al principio del estudio eran normo o hipercolesterolémicos, se vio que en el grupo de los normocolesterolémicos no había habido ninguna variación, mientras que ésta había

tenido lugar de manera muy marcada en el grupo de los hipercolesterolémicos (**Figura 37**), resultando en esa reducción significativa en el colesterol en el grupo FAU al considerarlo de manera global respecto del control. Hay que señalar que este descenso del colesterol sérico en los sujetos hipercolesterolémicos alcanzó el 13% y que se logró ya en los dos primeros meses de consumo de la FAU, y que se considera que, una reducción de tan sólo el 1% del colesterol plasmático ya significa una reducción del 2-3% del riesgo cardiovascular (Manson et al., 1992). Por otro lado, se debe señalar que, tras el lavado de 4 meses, los sujetos hipercolesterolémicos, aunque subieron un poco su colesterol sérico, mantuvieron una concentración de  $250 \pm 47$  mg/ dL, lo que sigue siendo una reducción significativa respecto de los valores iniciales ( $p = 0,003$ ). Estos resultados son, sin duda, importantes, y muestran el posible efecto que podría tener la FAU en la reducción del colesterol sérico como parámetro de riesgo cardiovascular.

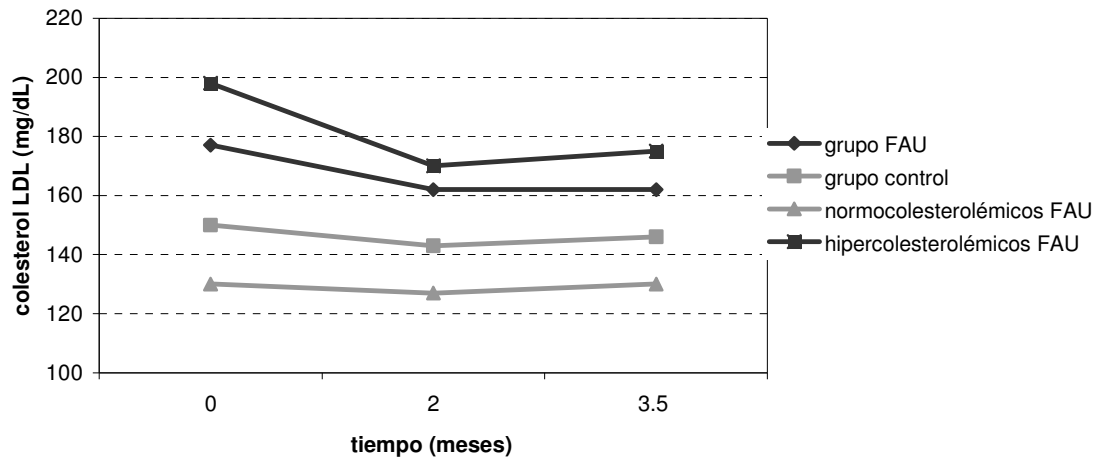
Resulta interesante señalar que, aunque en el grupo experimental se observó un descenso significativo en la ingesta de ácidos grasos saturados a lo largo del ensayo, cuando el grupo se dividió en función del nivel de colesterol inicial, no se observó ninguna variación significativa en los sujetos hipercolesterolémicos en la ingesta ni de estos compuestos, ni de los otros tipos de ácidos grasos, lípidos totales o colesterol. Por tanto, las variaciones observadas en este grupo serían atribuibles a la ingesta de Fibra Antioxidante de Uva y no a modificaciones en la dieta.

Respecto al mantenimiento en la reducción del colesterol tras el periodo de lavado, se podría considerar como un factor de distorsión en los resultados el hecho de que, dado que al acabar el periodo de ingesta de la FAU, los participantes conocieron los resultados de sus análisis y su evolución, podría haber habido una mayor preocupación por la salud y la dieta durante los meses de lavado que durante el ensayo. Aunque no se hizo un seguimiento dietético a lo largo del lavado, en el momento de realizar el análisis posterior al lavado, sí se preguntó a los voluntarios sobre posibles variaciones en sus hábitos dietéticos a lo largo de este periodo. A pesar de la subjetividad de esta pregunta, es significativo el hecho de que el 85% manifestaran haber comido lo mismo que durante el ensayo, un 5% más y tan sólo un 10% de los participantes declarasen haber reducido su ingesta durante el periodo de lavado.

También se obtuvieron resultados positivos en los que se refiere a los niveles de colesterol LDL (**Figura 38**). De nuevo, se observó una reducción significativa en el



grupo experimental respecto al grupo control y, cuando el grupo experimental se desglosó en normo e hipercolesterolémicos, se observó que la contribución de los hipercolesterolémicos a la reducción era tan grande que era lo que proporcionaba el descenso en el grupo experimental de manera global, ya que este descenso no tenía lugar en los normocolesterolémicos. En este sentido, otros trabajos también han observado que, tras la suplementación con un producto rico en fibra, el descenso en el colesterol total y en el LDL es superior cuanto mayores sean los niveles iniciales (Naumann et al., 2006) y, en estudios con ratas tratadas con dietas sin y colesterol, otros concentrados de fibra ricos en antioxidantes –algarroba, cacao- han mostrado efectos hipocolesterolémicos sólo en las ratas que siguieron la dieta con colesterol (Pérez-Olleros et al., 1999a; Pérez-Olleros et al., 1999b; Lecumberri et al., 2007). Estos efectos no se mantuvieron tras el lavado de 4 meses.



**Figura 38.** Evolución del colesterol LDL a lo largo del ensayo en el grupo FAU, en el grupo control y en los sujetos normo e hipercolesterolémicos del grupo FAU

En el caso del colesterol HDL, no se detectaron diferencias significativas a lo largo del ensayo entre el grupo experimental y el grupo control, como se puede ver en la **Tabla 35**. Cuando el grupo FAU se dividió en función del sexo, se observó que, en el grupo de las mujeres, tuvo lugar una bajada significativa de colesterol HDL en los dos primeros meses del estudio (pasando de  $52 \pm 14$  a  $47 \pm 12$  mg/dL), aunque en la última medida se recuperaron prácticamente los valores iniciales ( $51 \pm 14$ ). No obstante, éste sería un efecto no deseado a estudiar más detalladamente. Igualmente, en los sujetos hipercolesterolémicos se produjo una bajada inicial de colesterol HDL (de  $51 \pm 14$  a  $46 \pm 11$  mg/dL), habiendo una subida en la medida final ( $48 \pm 13$  mg/dL). En la medida en que la bajada de colesterol total fue tan pronunciada en este

subgrupo, resulta lógico que también afectara en parte al colesterol HDL, aunque, como se ha indicado anteriormente, el descenso fue mucho más marcado en el colesterol LDL.

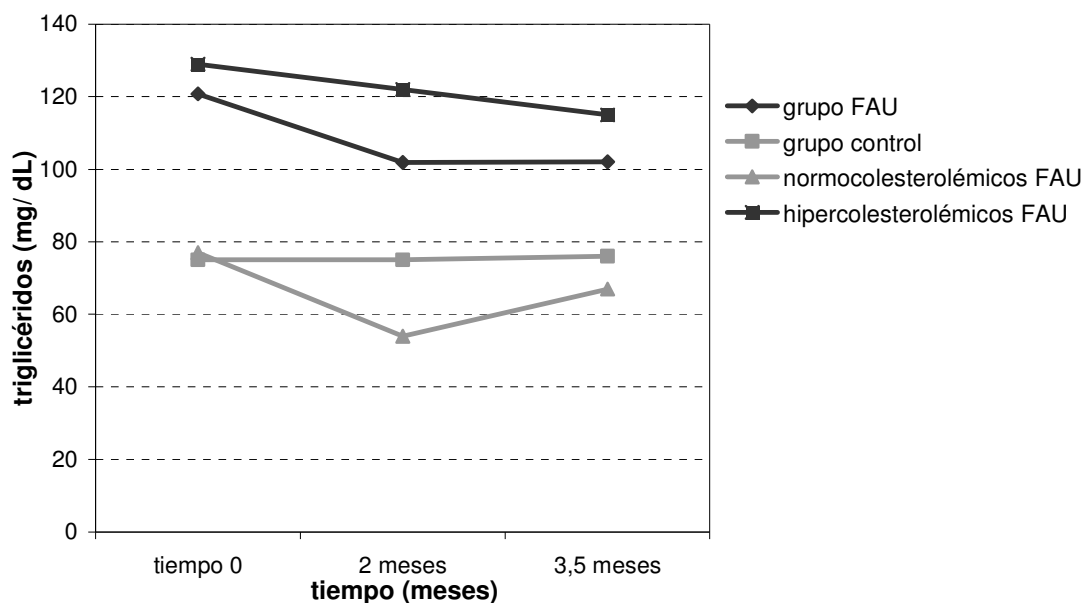
**Tabla 35.** Evolución del colesterol HDL (mg/ dL) en el grupo FAU y en el grupo control.

	tiempo 0	2 meses	3,5 meses
Grupo FAU	47 ± 13 <sup>a</sup>	45 ± 11 <sup>a</sup>	46 ± 13 <sup>a</sup>
Grupo control	42 ± 11 <sup>a</sup>	43 ± 8 <sup>a</sup>	44 ± 7 <sup>a</sup>

Distintos superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre grupos o entre tiempos

En lo que se refiere al índice HDL/LDL, no se apreciaron cambios significativos a lo largo del estudio.

La ingesta de la FAU también tuvo un efecto en la reducción de la concentración plasmática de triglicéridos, como se puede ver en la **Figura 39**, que compara los valores obtenidos en el grupo control y en el grupo experimental, aunque esta reducción no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, cuando el grupo experimental se dividió en función de los niveles iniciales de colesterol, el descenso sí resultó significativo en los hipercolesterolémicos, pasando de un valor inicial de 140 ± 81 a un valor final de 114 ± 62 mg/dL. Aunque tras los cuatro meses de lavado, el valor de los hipercolesterolémicos seguía siendo inferior al inicial, la diferencia había dejado de ser significativa.



**Figura 39.** Evolución de los triglicéridos (mg/ dL) en el grupo FAU y en el grupo control, y en los sujetos hiper- y normocolesterolémicos del grupo FAU

En un ensayo clínico en el que se proporcionó uva liofilizada a mujeres pre y post-menopáusicas (producto con un 34% de fibra y un 5,8% de polifenoles, 36 g/día, durante 4 semanas, 3 de lavado y 4 semanas más), se observó una bajada en los triglicéridos y las apolipoproteínas B y E. No se observaron cambios en la oxidación de LDLs (Yem et al., 2005). Así mismo, otro estudio que proporcionó 250 mL diarios de vino tinto a personas que no bebían habitualmente, detectó un descenso significativo en la ratio LDL/HDL, así como en los anticuerpos de LDLs oxidadas, a la vez que un aumento en el colesterol HDL (Avellone et al., 2006). También se observó una reducción significativa en los niveles de LDL colesterol y Apo B, así como en la relación LDL/HDL, y un aumento en el colesterol HDL y ApoA1 en personas sanas y hemodializadas, tras la ingesta de zumo de uva concentrado. Estas variaciones, salvo en el caso de Apo A1, se mantenían a las 4 semanas de la ingesta, pero habían desaparecido a los 6 meses (Castilla et al., 2006). Es de destacar que, en el caso de la Fibra Antioxidante de Uva, los efectos hipocolesterolémicos se mantuvieron en los sujetos hipercolesterolémicos tras cuatro meses de lavado.

Este último trabajo también encontró una reducción en las LDLs oxidadas que no se correlacionaba con el descenso en la concentración total de LDLs, indicando que, además de una reducción en la concentración de estas moléculas, hay otros factores que contribuyen a la reducción en la concentración de LDLs oxidadas.

También se han encontrado efectos positivos en la oxidación *ex vivo* de LDLs 1 h y 2 hs después de la ingesta de vino tinto, pero no de zumo de uva (Miyagi et al., 1997) y tras la ingesta de polifenoles de uva y etanol (Hayek et al., 1997; Xia, Allenbrand & Sun, 1998), pero no sólo de polifenoles de uva, indicando que la capacidad de solubilización de los polifenoles por parte del alcohol podría jugar un papel en este parámetro. No obstante, se debe señalar que en el trabajo de Xia, Allenbrand & Sun (1998) se observó que la suplementación sólo con etanol producía un aumento de la oxidación de LDLs *ex vivo*, por lo que el consumo de bebidas alcohólicas con un bajo contenido en polifenoles no mostraría este efecto positivo.

Un interesante estudio en hámsteres (Vinson, Teufel & Wu, 2001) sobre el efecto en los mismos de la ingesta de vino tinto, vino desalcoholizado y zumo de uva mostró que todas estas bebidas reducían significativamente el colesterol total y el LDL, así como los peróxidos lipídicos. El zumo de uva proporciona un índice aterogénico (colesterol total/ colesterol HDL) similar al del vino tinto y significativamente inferior al del resto de los grupos. Igualmente, el zumo de uva redujo significativamente el desarrollo de la aterosclerosis en la aorta, aunque en un grado inferior al del vino tinto. Para separar los efectos hipocolesterolémicos de los antiateroscleróticos, se hizo una correlación entre colesterol total e índice de aterosclerosis, que mostró que el efecto antiaterosclerótico de estas bebidas se debe a algo más que a su efecto hipolipidémico.

Otros trabajos realizados con polifenoles del vino tinto (Auger et al., 2002), con vino (Auger et al., 2005) o con extractos de uvas (Auger et al., 2004) también han encontrado efectos positivos en el perfil lipídico. Igualmente, trabajos previos del grupo en los que se suplementó a ratas con la FAU también encontraron efectos antihipercolesterolémicos significativos en las que seguían una dieta con colesterol (Martín-Carrón et al., 1999; Martín-Carrón, Saura-Calixto & Goñi, 2000), así como en el índice aterogénico y en la relación colesterol HDL: colesterol LDL.

No obstante, en otros trabajos con vino o subproductos de su elaboración, o no se han encontrado cambios en el perfil lipídico (Pignatelli et al., 2006) o incluso ha habido un efecto negativo (O'Byrne et al., 2002). Se debe tener en cuenta que aspectos como la elaboración de la muestra juegan un papel muy importante, dada la posible degradación de los polifenoles en función de las condiciones ambientales, y podrían explicar parte de estos resultados contradictorios. Así, en un trabajo en el que

sujetos con enfermedad coronaria fueron suplementados con zumo de uva sin que se encontraran cambios en el perfil lipídico, a diferencia de otros trabajos previos del mismo grupo, los autores sugirieron que esto se podía deber a una mala conservación del producto, a temperatura ambiente entre 4 y 6 meses (Chou et al., 2001)

Los mecanismos por los cuales los polifenoles pueden tener efectos hipocolesterolémicos no han sido todavía establecidos, aunque sí se ha mostrado cómo estos compuestos pueden absorber colesterol, ácidos biliares y otros lípidos de la dieta, incrementando su excreción fecal (Bravo et al., 1994a; Bravo et al., 1994b; Naumann et al., 2006). Se ha observado, por ejemplo, que el galato de epigallocatequina interfiere con la solubilización micelar del colesterol en el tracto digestivo de las ratas, reduciendo la absorción del mismo (Raederstoff et al., 2003), y que tanto el vino tinto tal cual como el desalcoholizado, reducen las concentraciones posprandiales de quilomicrones, retrasando posiblemente la absorción intestinal de grasas (Pal et al., 2004). Por otro lado, las variaciones positivas encontradas en los niveles de Apo A1 y ApoB en diversos estudios (Auger et al., 2005; Castilla et al., 2006) han hecho que se haya sugerido un posible efecto modificador de los polifenoles en el metabolismo de las lipoproteínas, a través de una eliminación hepática de colesterol.

De la misma manera, otros concentrados de fibra dietética –también con un alto contenido en antioxidantes- también ha mostrado efectos hipocolesterolémicos en distintos ensayos, como la fibra de algarroba empleada como ingrediente en la elaboración de pan o de barritas de frutas (Zunft et al., 2003) o como tal (Pérez-olleros et al., 1999a; Pérez-Olleros et al., 1999b), o la de cacao (Castelillejo et al., 2006; Lecumberri et al., 2007).

En este sentido, se ha señalado que la fibra dietética contribuye a reducir la absorción de triglicéridos en el intestino delgado (Galisteo et al., 2005) y se ha observado que la absorción de colesterol se reduce tras la ingesta de una bebida enriquecida en  $\beta$ -glucanos de la avena (Naumann et al., 2006) Así mismo, la fibra dietética da lugar en su fermentación a ácidos grasos de cadena corta, como el propiónico, que inhiben la síntesis de colesterol (Chara et al., 1999; Pérez-Olleros et al., 1999a). Por otro lado, también se ha planteado que la fibra puede intervenir directamente en el metabolismo de las lipoproteínas, aumentando el número de receptores hepáticos de las LDLs (Martín-Carrón et al., 1999) Para confirmar si un producto ejerce un efecto hipolipidémico mediante una reducción en la absorción de

grasas, resulta útil conocer la evolución en el peso de las deposiciones. Es muy difícil llevar esto a cabo en un ensayo en humanos, en particular en uno con el número de participantes y la duración de éste. No obstante, es interesante señalar que, como se refirió anteriormente, más de la mitad de los participantes del grupo experimental declararon haber notado un aumento en la cantidad por deposición tras la ingesta de la FAU.

Resulta interesante señalar que, en este trabajo, se han conseguido efectos positivos en el perfil lipídico proporcionando a los participantes cantidades de fibra muy inferiores a las de otros ensayos clínicos, que llegan a suministrar hasta 50 g/día (Chandalia et al., 2000), cantidades difícilmente incorporables a una dieta habitual.

Así mismo, la reducción en el colesterol conseguida por la FAU, de 2,53 mg/dL · g FAU en el colesterol total, y de 1,46 mg/dL · g FAU en el colesterol LDL, es más acusada que la que se concluyó, en un meta-análisis de ensayos sobre los efectos en el perfil lipídico de la fibra dietética, que la que poseen la fibra de avena y el psyllium, dos fibras conocidas por sus efectos hipocolesterolémicos (Brown et al., 1999). De acuerdo con este trabajo, la única fibra soluble que produciría un efecto superior al de la FAU sería la pectina (de 2,8 mg/dL · g pectina para el colesterol total y de 2,2 mg/dL · g pectina para el colesterol LDL, con una dosis diaria de 2-10 g, dependiendo del ensayo)

En conclusión, los efectos hipocolesterolémicos que se han observado tras la ingesta de la Fibra Antioxidante de Uva se podrían deber a una combinación de los efectos positivos de los distintos componentes bioactivos presentes en este producto. Resulta interesante señalar que, a diferencia de otros compuestos bioactivos que se pueden encontrar en el mercado con efecto hipocolesterolémico, como pueden ser los fitosteroles, la Fibra Antioxidante de Uva llevaría asociada otros efectos beneficiosos, como la regulación del tránsito intestinal.

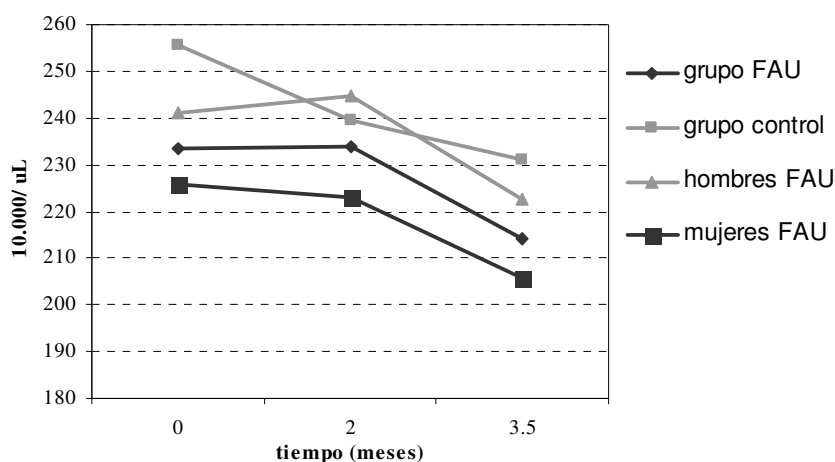
## 7.7

### **3.7.7 Recuento de plaquetas**

Otro de los parámetros analizados a lo largo del ensayo fue el recuento de plaquetas, considerando que las plaquetas son células claves en el proceso aterotrombótico. De hecho, en sujetos sanos que recibieron una dieta Mediterránea (relacionada con un menor riesgo de enfermedad coronaria) durante cuatro semanas,

se produjo un descenso en el recuento de plaquetas (Ambring et al., 2006). También se ha observado un mayor recuento plaquetario en sujetos con enfermedades ligadas de algún modo al proceso de envejecimiento, como la artritis reumatoide (Kamanl et al., 2002) o las cataratas (Goodrich et al., 1999)

La **Figura 40** muestra la evolución del recuento de plaquetas a lo largo del tiempo. Tanto en el grupo experimental como en el control, se produjo un descenso, aunque en ninguno de los dos casos fue significativo. Sin embargo, cuando el grupo experimental se dividió en función del sexo, tanto en hombres como en mujeres se observó un descenso significativo en el recuento de plaquetas a lo largo del ensayo. En concreto, el descenso desde la primera a la última medida fue del 8% en los hombres y del 9% en las mujeres.



**Figura 40.** Evolución en el recuento de plaquetas a lo largo del ensayo en el grupo FAU, en el grupo control y en el grupo FAU dividido por sexo

Este descenso no se mantuvo tras los cuatro meses de lavado.

No conocemos ningún otro trabajo en el que los antioxidantes del vino o subproductos hayan mostrado un efecto reductor en el recuento de plaquetas. Por lo tanto, éste sería otro efecto a destacar de la Fibra Antioxidante de Uva. No obstante, estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en lo que se refiere a la agregación plaquetaria. Así, tanto el vino blanco y el tinto, como el zumo de uva enriquecido en resveratrol, han mostrado un efecto protector en la agregación plaquetaria inducida por diferentes compuestos (Pace-Asciak et al., 1996). En concreto, en un interesante trabajo en perros suplementados con semilla de uva, con piel de uva o con ambas (Shanmuganayagam et al., 2002), se observó que los extractos por

separado no producían ningún efecto en la agregación plaquetaria, pero la combinación de ambos la redujo en un 31,9%, mostrando los efectos sinérgicos que aparecen en muchas ocasiones en el modo de acción de los polifenoles. Estos mismos autores mostraron, además, que cuando los extractos se proporcionaban junto con una enzima capaz de romper algunos de los enlaces restantes en los polifenoles, la agregación plaquetaria se reducía hasta en un 56,1%, abriendo la puerta a nuevas aplicaciones biotecnológicas para aumentar la biodisponibilidad de los polifenoles.

Por otro lado, en un ensayo en el que se suplementó a ratas con extractos de pulpa de uva o de piel de uva, se encontró un efecto cardioprotector en ambos casos. Los autores plantearon la posibilidad de que, dado que la pulpa tiene muchos menos antioxidantes que la piel, estos efectos se pudieran deber a otros compuestos que están en cantidades similares en ambas fracciones, como algunos ácidos orgánicos y ciertos azúcares (Falchi et al., 2006)

También se ha observado un efecto reductor en la acumulación de células espumosas en la aorta tras la ingesta de polifenoles de vino tinto (Hayek et al., 1997; Auger et al., 2002) y efectos positivos en la función endotelial de sujetos con síndrome metabólico tras la ingesta de una comida rica en carbohidratos y fibra (Brock et al., 2006)

## 7.8

### 3.7.8 Tensión arterial

La **Tabla 36** muestra la evolución en la presión arterial a lo largo del estudio, en el grupo experimental y en el grupo control. La ingesta de la FAU produjo una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) tanto en la P sistólica, pasando de  $126 \pm 22$  a  $118 \pm 20$  mm Hg, como en la P diastólica, cuyo valor evolucionó del  $78 \pm 12$  inicial al  $74 \pm 12$  mm Hg final, sin que se hubieran producido cambios significativos en la ingesta de sodio. Aunque en el grupo control se observó también un descenso en la P sistólica, éste no resultó significativo. Aunque en términos absolutos, el descenso no sea importante, puede indicar una tendencia a confirmar en estudios posteriores en sujetos hipertensos. De hecho, la mayoría de los trabajos publicados sobre el efecto de derivados de la uva o del vino en la tensión arterial están basados en sujetos hipertensos (Diebolt et al., 2001; Bernatova et al., 2002; Al-Awwadi et al., 2004)



Es interesante destacar que, tanto en la P sistólica como en la diastólica, el descenso tras la ingesta de la FAU llegó a ser significativo a los 3,5 meses y no a los 2, lo que indicaría que es necesario un consumo a largo plazo y no puntual de este producto para conseguir variaciones significativas en estos parámetros. Tras los cuatro meses de lavado, ambas presiones habían vuelto a los valores iniciales. En definitiva, aunque este descenso no haya sido particularmente acusado por las razones antes indicadas, muestra una tendencia en la que se debería seguir profundizando, tal vez proporcionando la FAU a sujetos hipertensos.

**Tabla 36.** Evolución de la P arterial en el grupo FAU y en el grupo control.

	P sistólica (mm Hg)		P diastólica (mm Hg)	
	grupo FAU	grupo control	grupo FAU	grupo control
0 meses	126 ± 22 <sup>a</sup>	121 ± 14 <sup>b</sup>	78 ± 12 <sup>a</sup>	71 ± 14 <sup>b</sup>
2 meses	123 ± 17 <sup>a</sup>	121 ± 13 <sup>b</sup>	75 ± 11 <sup>a,b</sup>	70 ± 6 <sup>b</sup>
3,5 meses	118 ± 20 <sup>b</sup>	114 ± 9 <sup>b</sup>	74 ± 12 <sup>b</sup>	71 ± 9 <sup>b</sup>

Distintos superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre grupos o entre tiempos (la estadística se ha aplicado de manera independiente a la P sistólica y a la P diastólica)

Por otro lado, estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos, que han mostrado efectos hipotensivos de la piel de uva o de polifenoles de uva en ensayos realizados con ratas (Bernatova et al., 2002; Soares de Moura et al., 2002; Al-Awwadi et al., 2004) También se apreció un efecto vasodilatador en el lecho cardiovascular mesentérico, que los autores pensaron que podría estar relacionado con su efecto antihipertensivo (Soares de Moura et al., 2002) En concreto, se ha propuesto que los polifenoles podrían ejercer su efecto antihipertensivo estimulando la liberación del óxido nítrico por el endotelio vascular, compuesto con efectos vasorelajantes, antiagregantes, con capacidad para limitar el flujo de proteínas plasmáticas aterogénicas hacia la pared arterial y que, a largo plazo, induce la expresión de genes protectores para el sistema cardiovascular (Chou et al., 2001; Diebolt, Bucher & Andriantsitohaina, 2001) Así mismo, se ha planteado que el vino puede regular el gen de eNOS, óxido nítrico sintasa, en células endoteliales, a través de factores transcripcionales y post-transcripcionales (Wallerath et al., 2003)

Además de este efecto en la liberación del NO, se ha propuesto que los polifenoles también podrían ejercer su acción antihipertensiva por otros mecanismos, ya que también se ha observado que la suplementación con polifenoles de uva en

ratas hipertensas produce una reducción de la fibrosis cardiaca, proceso que aparece en la hipertensión fruto de una deposición excesiva de colágeno y que, a su vez, se asocia con un aumento de las alteraciones en la función cardiaca y vascular (Bernatova et al., 2002)

La fibra soluble en forma de psyllium, por su parte, también ha mostrado efectos antihipertensivos, que se han atribuido a su capacidad para inhibir la absorción e iones sodio en el intestino delgado (Galisteo et al., 2005) De hecho, en un meta-análisis de 24 estudios sobre la relación entre el consumo de fibra y la P arterial, se determinó que la suplementación con una dosis media de 11,5 g fibra/día, reducía la presión sistólica de manera no significativa y la diastólica de manera significativa (Strepper et al., 2005) Resulta interesante destacar que, en este estudio, la Fibra Antioxidante de Uva ha mostrado un efecto significativo en la reducción tanto de la presión diastólica como de la sistólica, a pesar de que la cantidad proporcionada era considerablemente inferior a la cantidad media utilizada en los estudios comparados en el meta-análisis, entre los que solo un tercio emplearon cantidades iguales o inferiores a las empleadas por nosotros. Es decir, que el efecto hipotensivo de la Fibra Antioxidante de Uva, probablemente debido a la combinación de la fibra con los polifenoles, sería más destacado que el obtenido por otras fibras dietéticas más comúnmente estudiadas.

Este posible efecto hipotensivo de la Fibra Antioxidante de Uva podría tener consecuencias importantes en la prevención de ciertas enfermedades. De hecho, la preclampsia, una de las complicaciones más frecuentes durante el embarazo, caracterizada por una alta presión arterial, ha sido relacionada con el estrés oxidativo y en estos momentos se desarrolla un ambicioso ensayo clínico para ver el efecto que la suplementación con antioxidantes en mujeres embarazadas con diabetes tipo I podría tener en la prevención de la preclampsia (Holmes et al., 2004)

No obstante, es necesario realizar más investigaciones sobre este posible efecto antihipertensivo de los polifenoles, ya que en otro trabajo se observó que, mientras que los polifenoles de semillas de uva no mostraban ningún efecto sobre la tensión arterial, la combinación de estos con vitamina C producía un aumento significativo de la misma (Ward et al., 2005)

## 7.9

## 3.7.9 Marcadores de inflamacion

El proceso de inflamación está íntimamente relacionado con el daño cardiovascular. Así, se ha planteado que el proceso de aterosclerosis comienza con una oxidación de las LDLs, que son después capturadas por los monocitos, transformándose en macrófagos que se acumulan después en forma de células espumosas y liberando toda una serie de señalizadores químicos, algunos de los cuales, a su vez, participan directamente en el proceso de oxidación de biomoléculas. En este ensayo se midieron algunos marcadores de inflamación que, aunque pueden estar relacionados con el riesgo cardiovascular, también pueden aparecer aumentados en otros procesos inflamatorios (fosfatasa alcalina, fibrinógeno), así como otros parámetros que han sido relacionados de forma más directa con el riesgo cardiovascular en diversos estudios, como son la proteína C reactiva, la homocisteína y la neopterina. Los resultados de todos estos parámetros aparecen en la **Tabla 37**

**Tabla 37.** Evolución de marcadores de inflamación en el grupo FAU y en el grupo control.

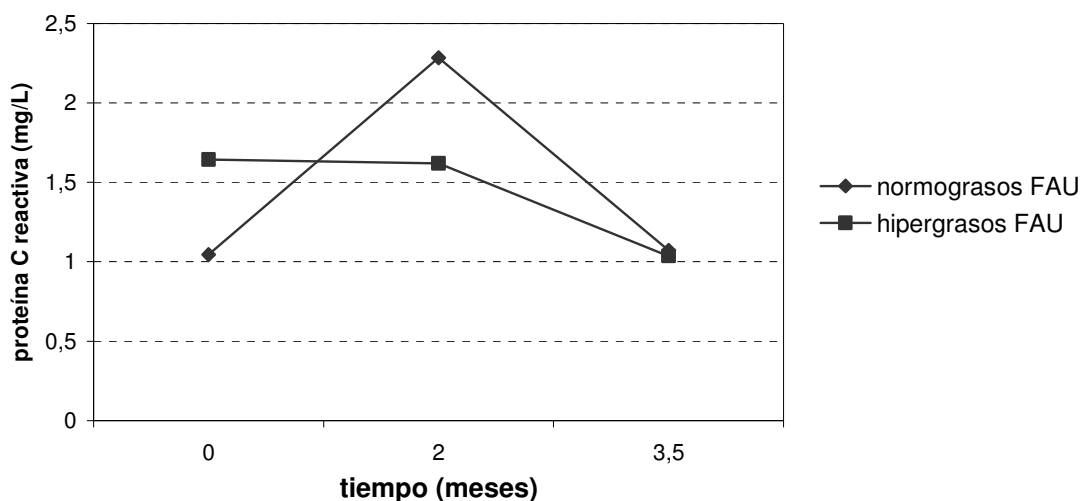
		tiempo 0	2 meses	3,5 meses
P-asa alcalina (U/L)	grupo FAU	144 ± 49 <sup>a</sup>	138 ± 45 <sup>b</sup>	134 ± 49 <sup>b</sup>
	grupo control	137 ± 28 <sup>b</sup>	135 ± 27 <sup>b</sup>	141 ± 32 <sup>b</sup>
Fibrinógeno (g/ L)	grupo FAU	3,71 ± 1,09 <sup>a</sup>	4,17 ± 0,86 <sup>b</sup>	3,65 ± 0,73 <sup>a</sup>
	grupo control	3,58 ± 1,00 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,62 <sup>b</sup>	3,50 ± 0,58 <sup>a</sup>
Proteína C reactiva (mg/ L)	grupo FAU	1,33 ± 1,33 <sup>a</sup>	1,93 ± 2,80 <sup>a</sup>	1 ± 1,04 <sup>a</sup>
	grupo control	1,28 ± 1,24 <sup>a</sup>	2,82 ± 1,45 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,81 <sup>a</sup>
Homocisteína (μmol /L)	grupo FAU	17,06 ± 7,69 <sup>a</sup>	14,43 ± 7,00 <sup>b</sup>	14,35 ± 4,54 <sup>a</sup>
	grupo control	19,13 ± 14,45 <sup>a</sup>	11,6 ± 3,91 <sup>b</sup>	15,08 ± 6,34 <sup>a</sup>
Neopterina (μmol neop/ mol creatinina)	grupo FAU	138 ± 65 <sup>a</sup>	140 ± 54 <sup>a</sup>	138 ± 64 <sup>a</sup>
	grupo control	131 ± 49 <sup>a</sup>	132 ± 38 <sup>a</sup>	135 ± 48 <sup>a</sup>

Distintos superíndices indican la existencia de diferencias significativas entre grupos o entre tiempos para cada una de las variables.

En primer lugar, se observó que, tanto la proteína C reactiva como en el fibrinógeno habían experimentado una subida importante entre la medida inicial y la medida realizada a los 2 meses tanto en el grupo experimental como en el grupo control, aunque esta subida sólo resultó significativa en el caso del fibrinógeno. A los 3,5 meses, se producía una vuelta a los valores iniciales en los dos grupos (en el grupo experimental, se eliminó para la estadística a un sujeto que mostró un valor de proteína C reactiva en la última medida de 24 mg/L, al haberse establecido que valores superiores a 15 corresponden claramente a una situación de infección).

Teniendo en cuenta que el estudio comenzó a mediados de marzo, el segundo análisis se realizó a mediados de mayo y el tercero a principios de julio, se consideró que estas variaciones podían tener relación con los niveles de polen ambiental y, por lo tanto, los valores incrementados de estos parámetros no tendrían una relación directa con el riesgo cardiovascular.

No obstante, hay que señalar que, a pesar de esta variación estacional, cuando los voluntarios se separaron en función del % de grasa inicial, en los sujetos hipergrasos tuvo lugar una reducción significativa en los niveles de proteína C reactiva, como se observa en la **Figura 41**. Resulta interesante destacar que los sujetos hipergrasos mostraban unos niveles iniciales de proteína C reactiva considerablemente más altos que los sujetos normograsos.



**Figura 41.** Evolución en la proteína C reactiva en los sujetos normograsos e hipergrasos del grupo FAU

Este descenso en la proteína C reactiva en los sujetos hipergrasos no se mantuvo tras los cuatro meses de lavado.

Así mismo, en el grupo que tomó la FAU se observó un descenso significativo en los niveles de fosfatasa alcalina, variación que no tuvo lugar en el grupo control donde, de hecho, hubo un ligero ascenso, aunque no significativo (**Tabla 37**) Tras cuatro meses de lavado, el descenso en la fosfatasa alcalina en el grupo experimental

se mantenía, y estaba próximo a ser significativo respecto de los valores de partida ( $p = 0,057$ )

Por lo que se refiere a la homocisteína, al contrario que en el caso del fibrinógeno y la proteína C reactiva, hubo, tanto en el grupo control como en el experimental, un descenso en la segunda medida, recuperándose los valores iniciales en la última medida. Igualmente, no se observaron variaciones en la neopterina al determinarla en el grupo control y el experimental, pero, al separar al grupo experimental en función del sexo, se observó que en los hombres se había producido un aumento significativo de la misma, pasando de  $125 \pm 49$  a  $138 \pm 51$   $\mu\text{mol neop/ mol creatinina}$ , mientras que en las mujeres hubo un descenso significativo, pasando de  $151 \pm 73$  a  $139 \pm 71$ .

Estos comportamientos diferentes en los distintos marcadores de inflamación determinados demuestran que, aunque todas estas moléculas formen parte del proceso de inflamación, las distintas etapas en las que son liberadas, su facilidad para modificar sus niveles o la influencia de otros factores ambientales no necesariamente ligados a la enfermedad cardiovascular, hacen que su evolución no sea pareja. De hecho, como se muestra en la **Tabla 38**, cuando se determinaron las correlaciones entre los distintos marcadores de inflamación analizados, sólo se encontraron correlaciones significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre la fosfatasa alcalina y la proteína C reactiva y entre la fosfatasa alcalina y la homocisteína, y, aun así, con unos valores de  $R^2$  extraordinariamente bajos.

**Tabla 38.** Valores de  $R^2$  obtenidos para la correlación entre marcadores de inflamación (entre paréntesis, valores de  $p$  obtenidos)

	Proteína C reactiva	Homocisteína	Fibrinógeno	P-asa alcalina
Neopterina	0,001 ( $p = 0,759$ )	0,16 ( $p = 0,121$ )	0 ( $p = 0,942$ )	0,023 ( $p = 0,103$ )
P-asa alcalina	0,071 ( $p = 0,002$ )	0,113 ( $p = 0,00$ )	0,002 ( $p = 0,66$ )	-----
Fibrinógeno	0,013 ( $p = 0,193$ )	0,009 ( $p = 0,295$ )	-----	-----
Homocisteína	0 ( $p = 0,810$ )	-----	-----	-----

Estudios epidemiológicos han encontrado una relación clara entre diversos marcadores de inflamación y la ingesta de fibra y/o polifenoles: un ensayo, basado en

la elaboración de diversos recordatorios de 24 hs. sobre una población, para conocer su ingesta de fibra, y en cinco medidas de proteína C reactiva a lo largo de un año, encontró una relación inversa entre los niveles de este compuesto y la ingesta de fibra dietética total, fibra soluble y fibra insoluble (Ma et al., 2006). Igualmente, se ha observado que las dietas con un consumo elevado de alimentos de origen vegetal y cereales integrales se correlacionan negativamente con los niveles de proteína C reactiva, mientras que las que tienen un consumo bajo de alimentos de origen vegetal y alto de cereales refinados, lo hacen positivamente (López-García et al., 2004)

Estudios en cultivos celulares tratados con agentes inflamatorios y a los que después se les ha añadido extractos de vino han mostrado cómo estos reducían la liberación de marcadores de inflamación, como son la neopterinina y la ratio triptófano/kynurenina (Neurauter et al., 2004). Por lo que se refiere a los ensayos de intervención, un trabajo en el que se proporcionaba vino tinto a personas que no eran bebedores habituales, encontró un descenso en los niveles de proteína C reactiva y fibrinógeno (Avellone et al., 2006) Igualmente, Estruch et al. (2004) mostraron que el consumo de vino tinto reduce la expresión en monocitos de LFA-1, Mac-1, VLA-4 y MCP-1, así como de VLA-4 en linfocitos T y los niveles plasmáticos de VCAM-1, ICAM-1, Proteína C reactiva, IL-1 $\alpha$  y fibrinógeno (estos dos últimos efectos también se observaron tras la ingesta de ginebra, por los que podrían estar más relacionados con la presencia de alcohol que con la de polifenoles)

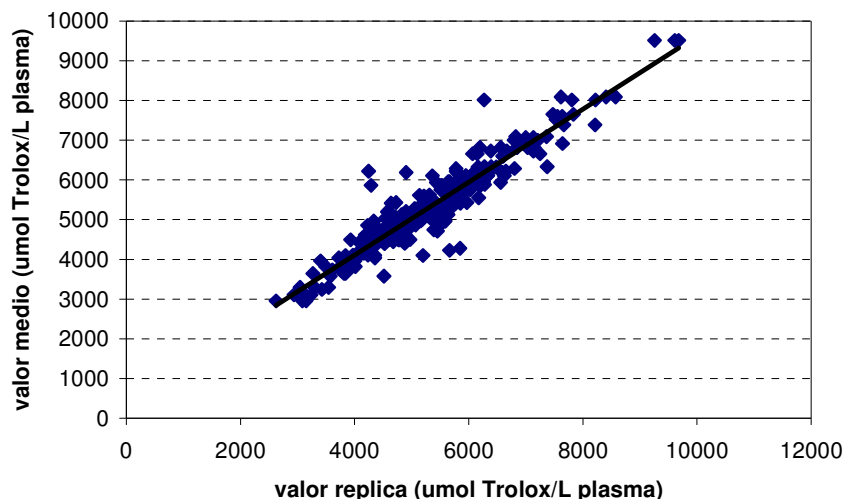
Por el contrario, en el estudio antes comentado con mujeres pre y post-menopáusicas que tomaron uva liofilizada (Yem et al., 2005), no hubo modificaciones en la proteína C reactiva, a pesar de los efectos positivos observados en el perfil lipídico, aunque si hubo un descenso del TNF- $\alpha$ . Estos resultados contradictorios muestran la dificultad para observar un efecto claro en marcadores de inflamación tras la ingesta de fibra y/o polifenoles, así como que aún no existe un consenso sobre qué marcadores de inflamación serían los más adecuados en estudios de intervención sobre el efecto de productos naturales en la prevención de riesgo cardiovascular.

## **7.10**

### **3.7.10 Status antioxidante**

El status antioxidante de los participantes en el ensayo se determinó en plasma a través de los métodos de capacidad antioxidante total FRAP y ABTS, así como del marcador de oxidación lipídica MDA. Igualmente, se determinaron los polifenoles totales en orina por el método Folin. Como se ha indicado, al tratarse de métodos no

incorporados aún a la práctica clínica rutinaria, las medidas se realizaron por triplicado en cada uno de los sujetos y, representando la media para cada sujetos frente a cada una de sus réplicas, se obtuvo el error asociado a cada uno de los métodos, para después considerar si las variaciones observadas en el tiempo formaban parte o no de ese error asociado. La **Figura 42** muestra cómo este procedimiento se llevó a cabo en el método ABTS, obteniendo en este caso un error asociado al método del 7%.

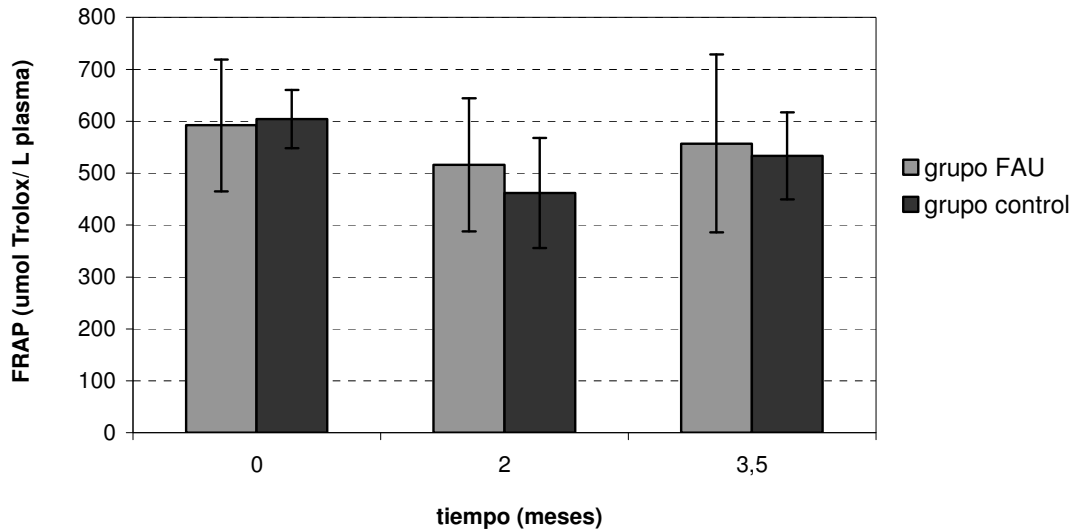


**Figura 42.** Representación de los valores de las réplicas para cada uno de los sujetos frente al valor medio de cada sujeto en el método ABTS

La **Figura 43** muestra los valores obtenidos en el método FRAP a lo largo del estudio. Tanto en el grupo experimental como en el grupo control se produjo un descenso de la capacidad antioxidante determinada por este método a los dos meses de empezar el ensayo, recuperando o acercándose a los valores iniciales al finalizar el mismo. Cuando el grupo experimental se dividió en función del sexo o del nivel inicial de colesterol, la misma tendencia se observó en todos los subgrupos. Dado que este comportamiento era similar al indicado anteriormente para ciertos marcadores de inflamación, se consideró que, de alguna manera, factores estacionales y, en particular, los niveles de polen ambiental y un estado general del organismo de activación de la respuesta inflamatoria, podrían haber influido en la capacidad antioxidante plasmática.

Se debe señalar que, a pesar de que en el grupo control tuvo lugar un aumento significativo en la ingesta de carotenoides, pasando de  $1835 \pm 1281$  a  $2469 \pm 470$   $\mu\text{g}/\text{día}$ , sin que esto produjera ningún aumento en la capacidad antioxidante plasmática,

sino que, como se ha comentado, los controles siguieron el mismo comportamiento que los sujetos del grupo experimental.

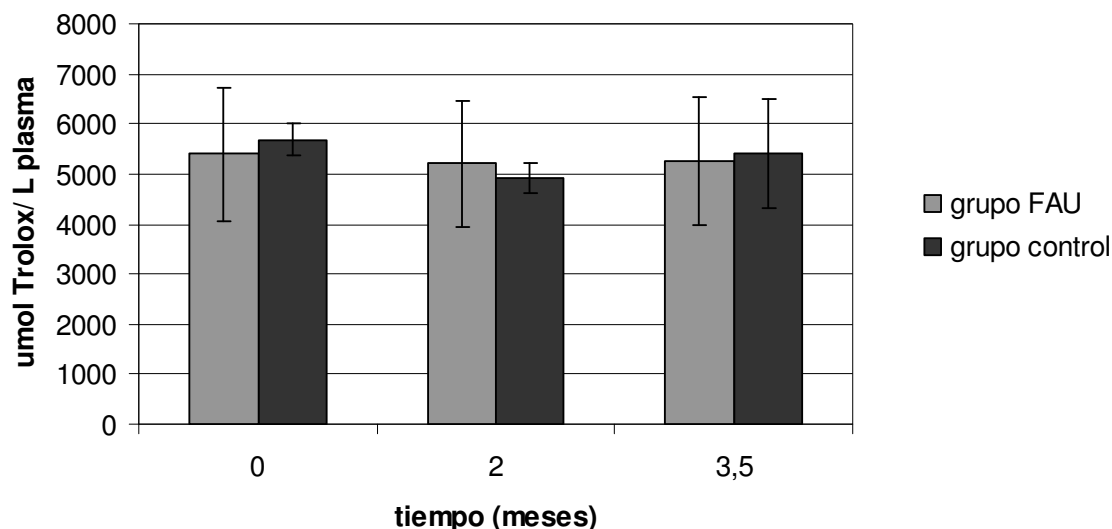


**Figura 43.** Evolución del valor FRAP en el grupo FAU y en el grupo control

Resulta interesante remarcar que, a pesar de las numerosas críticas existentes a los métodos de medida de capacidad antioxidante plasmática, el comportamiento referido en los valores de FRAP se observó, en mayor o menor medida, en todos los sujetos participantes en el estudio, por lo que, aunque factores individuales o relacionados con la ingesta del día previo puedan jugar un papel en la determinación de capacidad antioxidante y, por tanto, hacer que no sea un método adecuado para medir el status antioxidante de individuos aislados, sí aparece ser un método más apropiado para medir la evolución en grupos de población.

En lo que se refiere al método ABTS, los resultados obtenidos aparecen en la **Figura 44**. Aparece la misma tendencia que en el caso del método FRAP, con un descenso generalizado (tanto en el grupo control como en el grupo experimental) de la capacidad antioxidante a los 2 meses y un acercamiento a los valores iniciales a los 3,5 meses. La misma tendencia aparece al separar al grupo experimental en función del sexo o el nivel inicial de colesterol, lo que refuerza la explicación de la posible interferencia de factores ambientales. Por otro lado, las medidas realizadas por ambos métodos de capacidad antioxidante, mostraron una correlación significativa ( $p = 0,0$ )





**Figura 44.** Evolución del valor ABTS en el grupo FAU y en el grupo control

Así mismo, resulta interesante señalar que, tanto en el método FRAP como en el ABTS se obtuvieron valores más elevados de capacidad antioxidante plasmática en los sujetos hipercolesterolémicos que en los normocolesterolémicos, en contra de lo que cabría esperar, al estar en principio un mayor status antioxidante relacionado con un estilo de vida más sano, con mayor ingesta de frutas y verduras, y, por tanto, menor incidencia de factores de riesgo cardiovascular, como pueden ser niveles elevados de colesterol. Éste sería sin duda, un aspecto a profundizar en sucesivos estudios, al poder ser una clave para entender mejor el proceso de metabolización de polifenoles y a qué compuestos viajan asociados, que, según estos resultados, podrían ser las distintas lipoproteínas que transportan el colesterol.

Otros trabajos que han medido capacidad antioxidante plasmática tras la ingesta prolongada de productos ricos en antioxidantes han encontrado resultados contradictorios. Así, Castilla et al. (2006) encontraron un aumento significativo en los valores de ABTS en individuos sanos y hemodializados tras consumir durante dos semanas concentrado de zumo de uva, valores que volvieron al nivel basal tras un lavado de 4 semanas. En este mismo trabajo, no se encontró ninguna variación en los niveles plasmáticos de vitamina C o E. Sin embargo, cuando se decidió estandarizar la concentración de vitamina E, dividiéndola entre la concentración de colesterol, se encontró un aumento significativo. También se ha observado un aumento en los

valores plasmáticos de ABTS en hámster tras la ingesta de polifenoles de vino tinto (Auger et al., 2002) o de vino (Auger et al., 2005)

Simonetti et al. (2002), por su parte, llevaron a cabo un trabajo en el que suplementaron a humanos con 1100 mg/día de procianidinas de semilla de uva durante 30 días, sin encontrar un efecto significativo sobre la capacidad antioxidante del plasma, determinada por el método TRAP, aunque sí una reducción del daño a ADN de linfocitos. En este mismo ensayo, se observó que, aunque no había cambios en los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol, sí los había en los de este compuesto en eritrocitos, lo que reforzaría la hipótesis de que los polifenoles ayudan a la regeneración de este antioxidante.

En otro trabajo (O'Byrne, 2002) en el que se suplementó a los voluntarios con zumo de uva concentrado o con vitamina E durante 2 semanas, sí hubo un aumento significativo de la capacidad antioxidante determinada por ORAC en los dos grupos.

Por otro lado, en un ensayo previo realizado por nuestro grupo en ratas, en el que se compararon los efectos en la capacidad antioxidante cecal de ratas suplementadas con Fibra Antioxidante de Uva como fuente de fibra dietética o con celulosa, se observó un aumento del contenido en polifenoles extraíbles y taninos condensados, así como de la capacidad antioxidante asociada a los mismos, tanto en el contenido cecal, como en las heces, en aquellas ratas que tomaron la FAU (Goñi & Serrano, 2005)

Así mismo, ha habido ensayos que, aunque no han encontrado efectos positivos en la capacidad antioxidante plasmática, sí los han observado en otros parámetros, tras el consumo de extractos de uvas o vino (Auger et al., 2002) Esta disparidad de resultados también plantea la cuestión de cuál es el método más adecuado para medir capacidad antioxidante *in vivo*, ya que, como se ha indicado, en algunos de los métodos había una tendencia a observar cambios tras la suplementación con un producto rico en polifenoles, mientras que en otro no. Otro trabajo que realizó una medida poco usual, como es la producción de anión superóxido en la aorta y en el tejido coronario, tras suplementar a ratas con polifenoles de uva, encontró un efecto positivo en estos parámetros (Al-Awwadi et al., 2004)

En general, podría ocurrir que la medida de la concentración de antioxidantes concretos en plasma y/o orina fuera útil horas después de la ingesta de un producto

rico en antioxidantes para observar si está habiendo una absorción del mismo, pero no para observar los efectos a medio y largo plazo de la ingesta regular de este producto, que se verían reflejados en otros parámetros, como ha ocurrido en el presente estudio. En este sentido, se ha observado que tras la ingesta de productos ricos en polifenoles hay un aumento post-prandial de la capacidad antioxidante del plasma para, horas después, volver a valores iniciales, al ser recirculados a tejidos en los que ejercerían sus propiedades antioxidantes. Por ejemplo, un trabajo midió los efectos en los niveles de quercetina tras la ingesta de zumo de uva concentrado, observando que a las 3 hs. se producía un aumento del 25% en aquellas personas que habían tomado el zumo, y no en el grupo control, volviendo después de unas horas a los niveles basales (Castilla et al., 2006)

De la misma forma, la suplementación con vino tinto o con vino blanco también ha dado lugar a un aumento de los polifenoles en plasma, especialmente en el caso del vino tinto (Pignatelli et al., 2006) Así mismo, un interesante trabajo en el que se suplementó a ratones deficientes en apolipoproteína E con vino tinto, catequina o quercetina (estando estas dos últimas en un medio con un contenido alcohólico similar al del vino escogido), observó que en las LDLs de los grupos suplementados había catequina y/o quercetina, pero no en las del grupo control, determinándose que parte de los polifenoles absorbidos podrían circular después asociados a las LDLs (Hayek et al., 1997)

Las medidas de capacidad antioxidante en plasma se complementaron con la determinación de polifenoles totales en orina por el método Folin. Las medidas se efectuaron por triplicado, y se determinó un error asociado al método del 5,8%. Los valores obtenidos, expresados en mg catequina/g creatinina, aparecen en la **Tabla 39**

**Tabla 39.** Valores de polifenoles totales en orina (mg quercetina/g creatinina) determinados por el método Folin en el grupo FAU y en el grupo control

	tiempo 0	2 meses	3,5 meses
Grupo FAU	134 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	148 $\pm$ 43 <sup>a</sup>	175 $\pm$ 35 <sup>b</sup>
Grupo control	139 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	115 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	125 $\pm$ 43 <sup>a</sup>

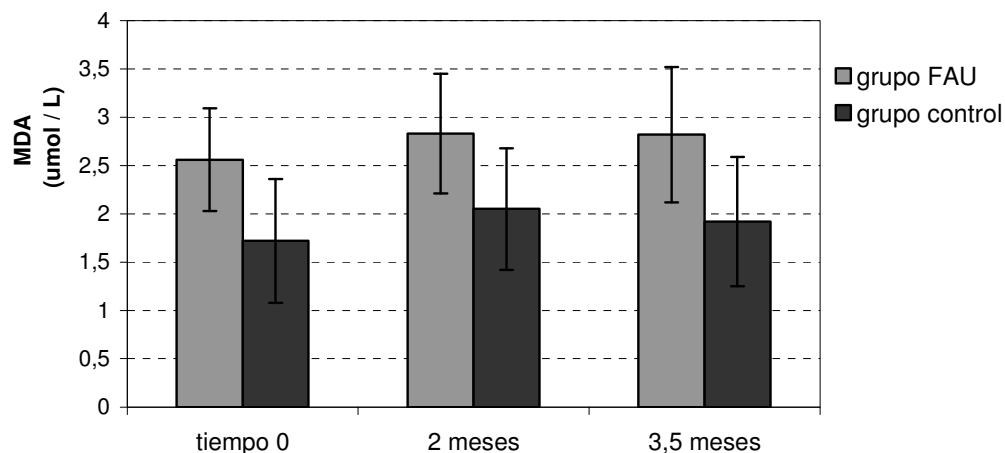
Distintos superíndices indican diferencias significativas entre filas o columnas

Se puede observar cómo los dos grupos comenzaron el estudio con concentraciones similares de polifenoles en la orina y en el grupo FAU se produjo un aumento a lo largo del ensayo que, al final del mismo, resultó ser significativo. Este dato no concuerda exactamente con la evolución que tuvo lugar con la capacidad antioxidante plasmática, por lo que se debería confirmar en ensayos posteriores, pero indicaría una posible tendencia y podría mostrar que parte de los polifenoles ingeridos con la Fibra Antioxidante de Uva son absorbidos.

Finalmente, el status antioxidante también se determinó a través de la medida por HPLC de MDA plasmático, un marcador de peroxidación lipídica. Resulta necesario indicar que factores como las altas temperaturas empleadas y el amplio grado de manipulación de la muestra pueden afectar a la determinación de MDA y pueden explicar las elevadas diferencias existentes obtenidas para los valores de MDA plasmático en humanos. Así mismo, incluso el agente anticoagulante utilizado para recoger la muestra (citrato, AEDT, etc.) influye en los resultados de MDA (Suttnar, Masova & Dir, 2001)

Por estas razones, aunque los valores absolutos de concentración de MDA no puedan ser estrictamente tenidos en cuenta, el valor relativo entre dos o más grupos que han sido analizados en las mismas condiciones experimentales puede ser una aproximación en la evaluación del papel de la peroxidación lipídica en el desarrollo de ciertas enfermedades o en estudios nutricionales que intenten elucidar el papel de los compuestos antioxidantes de la dieta (Pulido, 2003)

Los resultados obtenidos en este ensayo en la determinación de MDA plasmático aparecen en la **Figura 45**. Se observa un aumento significativo de este marcador a los dos meses del ensayo tanto en el grupo control, como en el experimental, valor que sufre un ligero descenso al final del ensayo. Prácticamente, esta evolución se produjo de la misma manera en los mismos individuos. Por ejemplo, en la **Figura 46** se muestran los cromatogramas correspondientes a un sujeto del grupo experimental y a otro del grupo control a lo largo del ensayo, pudiéndose ver como en ambos la concentración de MDA evoluciona de forma pareja con el tiempo.

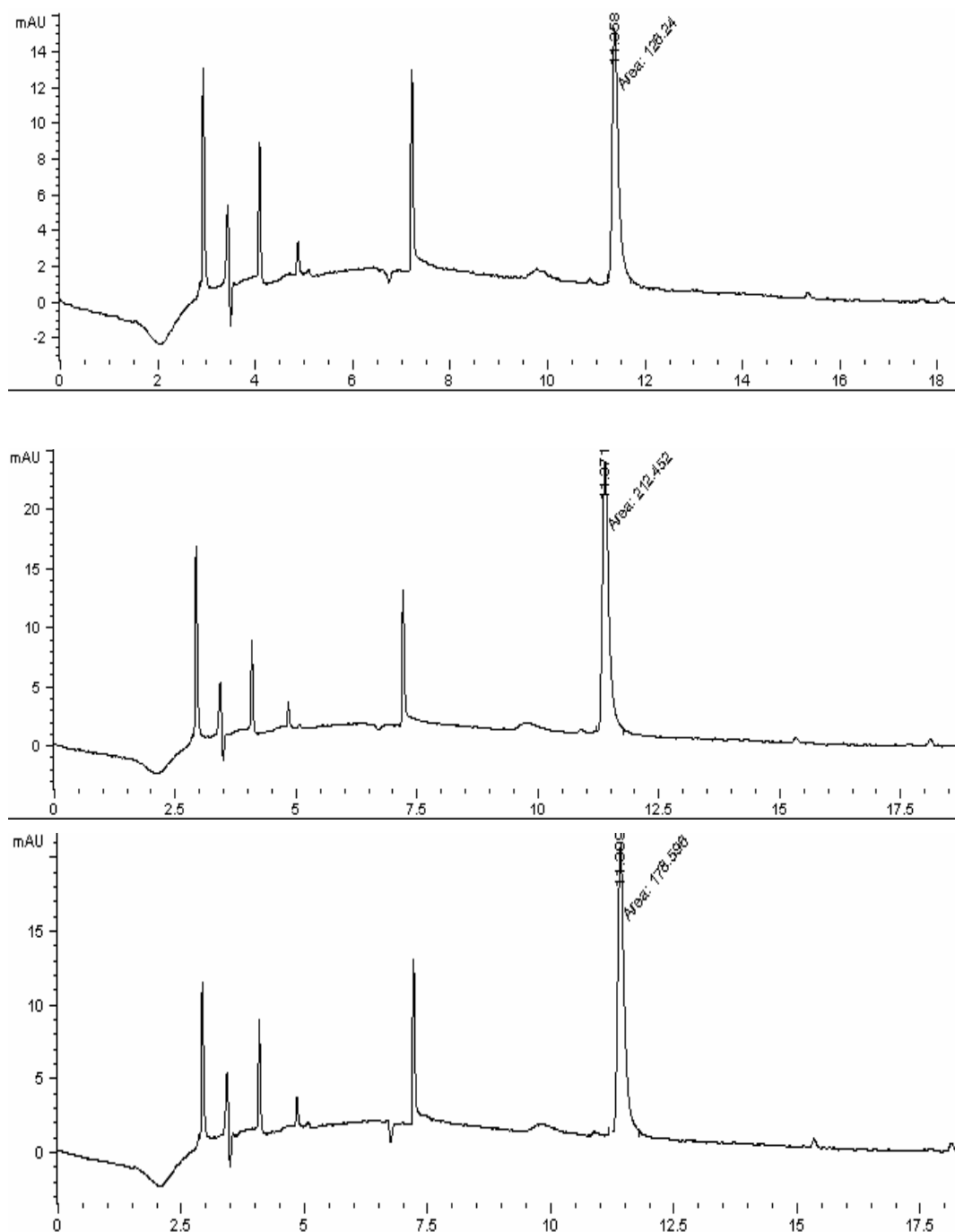


**Figura 45.** Evolución del MDA en el FAU y en el grupo control

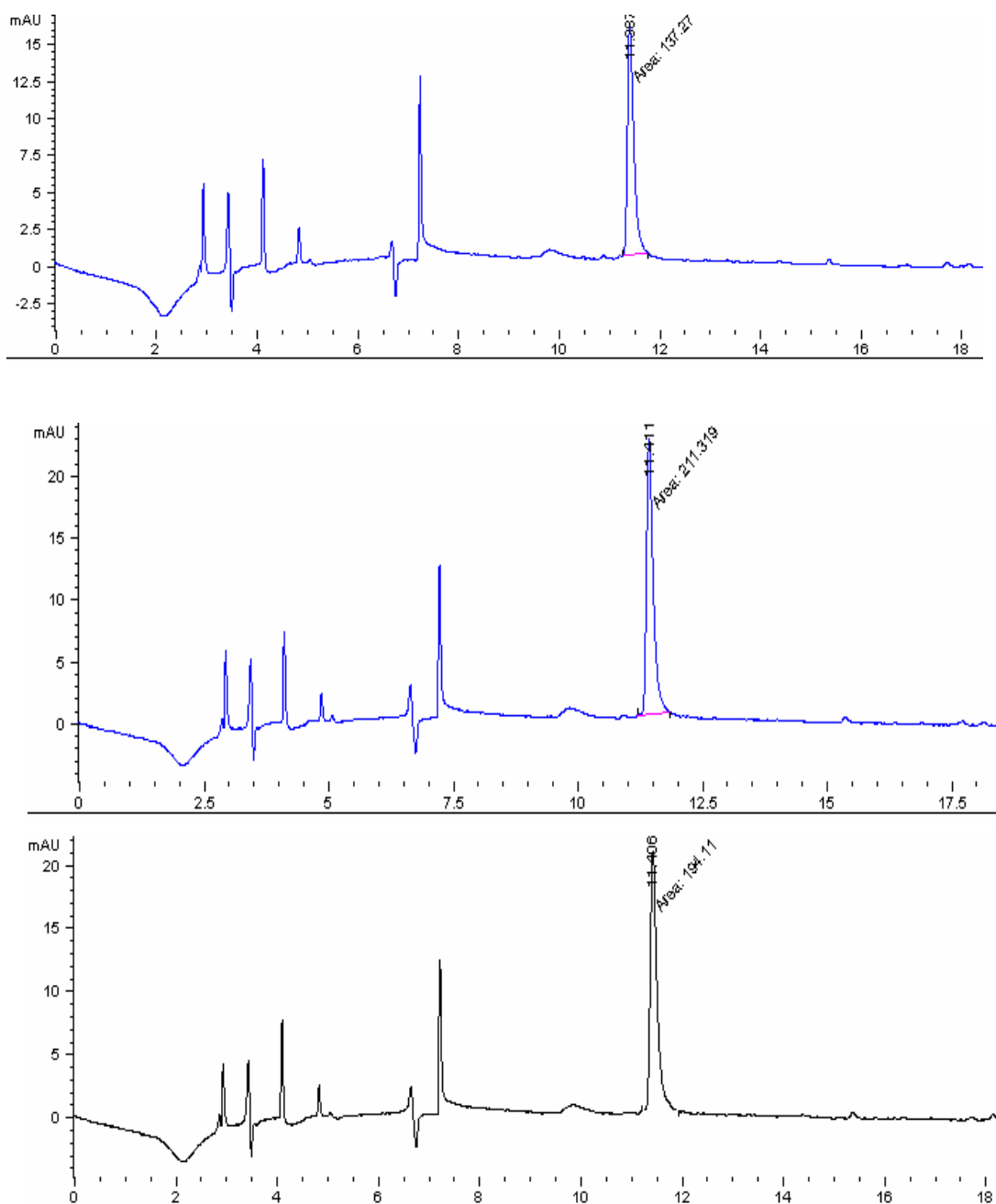
La misma tendencia se observó al separar al grupo experimental en función del sexo y la concentración inicial de colesterol, por lo que se atribuyó a los factores estacionales anteriormente referidos, frente a los que la FAU no habría sido capaz de ejercer un efecto protector. Resulta interesante destacar que los niveles de MDA resultaron más altos en los varones, hipercolesterolémicos y con más de 30 años de edad.

El MDA no mostró correlación con los valores de FRAP ni de ABTS, mostrando que, a pesar de que todos son indicadores del status antioxidante de una persona y en los tres métodos se determinó un empeoramiento del status antioxidante en los dos grupos a lo largo del ensayo, cada uno de ellos está influenciado por otras características individuales, componentes del plasma que interfieren, etc., que hacen que no se pueda observar una relación directa entre los mismos.

Aunque algunos estudios han descrito una bajada en los niveles de MDA tras la ingesta durante varias semanas de un producto rico en antioxidantes (Alessio et al., 2002; Gorinstein et al., 2002; Auger et al., 2005), los resultados en este terreno siguen siendo contradictorios. Así, en un estudio realizado por Yamakoshi et al. (1999), en el que se suplementó a conejos con extractos de uvas, no se encontraron variaciones en los niveles plasmáticos de MDA, pero sí en la presencia de MDA en la aorta.



**Figura 46 a).** Cromatogramas correspondientes a los valores de MDA plasmático de un sujeto del grupo control: superior, tiempo 0; intermedio, 2 meses; inferior, 3,5 meses



**Figura 46 b).** Cromatogramas correspondientes a los valores de MDA plasmático de un sujeto del grupo experimental : superior, tiempo 0; intermedio, 2 meses; inferior, 3,5 meses

En otros trabajos basados en la suplementación con uva liofilizada a mujeres menopáusicas (Yem et al., 2005) o vino tinto o vino blanco a voluntarios sanos (Pignatelli et al., 2006), si se ha observado una reducción en la excreción urinaria de isoprostanos, otro marcador de peroxidación lipídica, aunque esto no se ha visto en la suplementación a individuos sanos con zumo de uva (O'Byrne et al., 2002). Sin embargo, en este último estudio sí se observó una reducción significativa en plasma de los grupos carbonilos procedentes de la oxidación de proteínas.

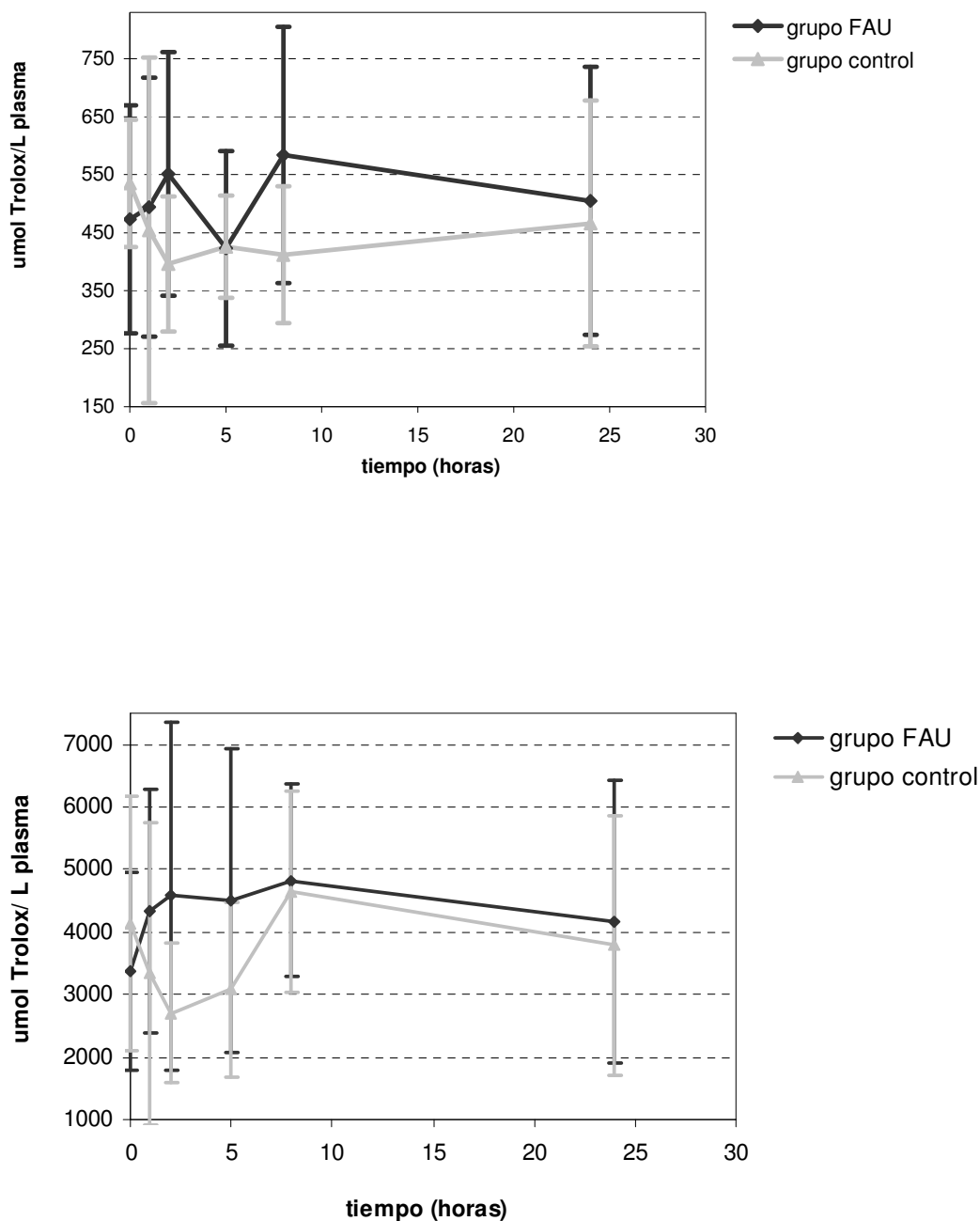
No obstante, resulta interesante señalar que, en los últimos años, se ha planteado una hipótesis sobre el mecanismo por el que los polifenoles inhiben la aterosclerosis, no directamente a través de un efecto antioxidante, sino, como se ha indicado previamente, induciendo la liberación de NO y produciendo, por tanto, una vasorelajación dependiente del endotelio, inhibiendo la proliferación de células en el músculo liso o regulando moléculas de adhesión (Auger et al., 2005). Sin duda, son necesarias más investigaciones para confirmar estas hipótesis, pero la explicación de un efecto positivo de los polifenoles más allá de su acción antioxidante, permitiría, sin duda, explicar parte de los resultados obtenidos en los últimos años en ensayos *in vivo*, donde los antioxidantes han mostrado efectos positivos en distintos parámetros, sin que esto se reflejara necesariamente en una mejora de los marcadores de status antioxidante.

En este sentido, posteriormente se llevó a cabo un ensayo, cuyos resultados son todavía preliminares, con el objetivo de determinar si los polifenoles de la FAU son o no efectivamente absorbidos y, por tanto, los efectos observados tras la ingesta de la FAU se deben a los mismos. Para ello, se determinó la capacidad antioxidante plasmática de 10 sujetos a distintas horas después de haber ingerido 15 g de FAU y de cuatro sujetos control que no la habían consumido. Los resultados para los métodos FRAP y ABTS se muestran en la **Figura 47**. Se puede ver cómo, por ambos métodos, se produce un aumento en la capacidad antioxidante plasmática tras la ingesta de FAU con picos a los tiempos 2 y 8 hs, aumento que, en el método ABTS, llega a ser significativo a las 8 hs de la ingesta (pasando la capacidad antioxidante de  $3374 \pm 1595$  a  $4828 \pm 1536$   $\mu\text{mol Trolox/L plasma}$ , respectivamente). Ese aumento no tuvo lugar en el grupo control.

Aunque estos resultados deben ser confirmados mediante procedimientos más precisos, como HPLC-MS, indicarían que, efectivamente, parte de los polifenoles de la FAU son absorbidos, resultados que concordarían con los obtenidos en las medidas



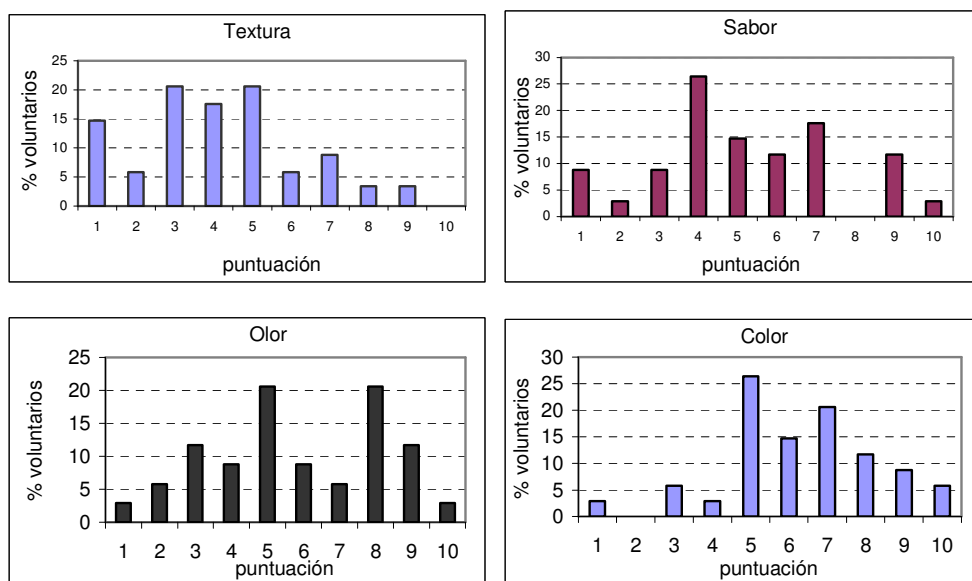
de Folin en la orina y que explicarían los efectos positivos observados tras la ingesta de la Fibra Antioxidante de Uva. Estos resultados indicarían, por primera vez, que los antioxidantes asociados a la Fibra Antioxidante de Uva son biodisponibles, ya que, aunque se han realizado numerosos estudios de este tipo en diferentes alimentos y bebidas, no se habían llevado a cabo, según nuestro conocimiento, en una matriz rica tanto en fibra como en antioxidantes.



**Figura 47.** Evolución de la capacidad antioxidante plasmática por el método FRAP (arriba) y ABTS (abajo) en el grupo FAU y en el grupo control.

### 3.7.11 Valoración del producto por los voluntarios

Al terminar el estudio, se realizó una encuesta entre los voluntarios para conocer su percepción sobre las características sensoriales de la FAU, así como sobre los efectos observados (sus opiniones respecto a los efectos en el tránsito gastrointestinal ya fueron comentadas al discutir los efectos de la FAU en este aspecto). La **Figura 48** muestra la puntuación que dieron al sabor, olor, color y textura de la FAU, indicando el 1 la puntuación más baja y el 10 la más alta.



**Figura 48.** Percepción de las características sensoriales de la FAU al finalizar el ensayo

Se puede observar que la valoración fue bastante positiva en lo referente al color y olor del producto, no tanto en el sabor y claramente negativa en la textura, aspecto en el que más de la mitad de los participantes le dan una puntuación por debajo de 5. Igualmente, ante la pregunta “¿Que es lo que menos le ha gustado de la FAU?” el 35% respondieron que la textura y el 32% que la poca solubilidad, aspectos íntimamente relacionados.

En cualquier caso, el 73,5% de los voluntarios consideró el efecto global de la FAU como positivo y nadie lo considero negativo. A la pregunta “¿Incorporaría usted la FAU a su dieta de manera habitual?”, el 50% respondió que sí y el 20% que sí, pero con cambios (probablemente referentes a las características de solubilidad indicadas

anteriormente), por lo que la aceptación del producto por parte de los voluntarios se puede considerar como enormemente positiva.

Igualmente, en esta encuesta final se incluyeron preguntas referentes al propio desarrollo del estudio. Es interesante destacar que el 96,6% consideró la información proporcionada como adecuada o muy adecuada, el 97,6% considero que sus datos habían sido tratados con la suficiente discreción y el 78,6% dio una calificación de 10 al trato dado por los investigadores. Estas respuestas demuestran la importancia del seguimiento constante, la motivación por parte de los investigadores y el proporcionar toda la información requerida para lograr que los voluntarios completen satisfactoriamente un ensayo clínico de estas características.

*En resumen,*

- *Los principales efectos observados tras la ingesta, durante 3,5 meses, de Fibra Antioxidante de Uva en sujetos normo e hipercolesterolémicos, y tras comparar los resultados con un grupo control, fueron:*

- *Aumento significativo del tránsito gastrointestinal en los sujetos con un número semanal de deposiciones al inicio de 7 o menos*

- *Disminución significativa, en particular en los sujetos hipercolesterolémicos, del colesterol total, del colesterol LDL y de los triglicéridos.*

- *Descenso significativo de la concentración de plaquetas.*

- *Disminución significativa del porcentaje de grasa corporal en las mujeres y en los sujetos hipergrasos*

- *Posibles efectos positivos en la glucemia y en la tensión arterial, que se deberían estudiar en ensayos posteriores*

- *La ingesta de Fibra Antioxidante de Uva, a pesar de tener efectos positivos en parámetros de riesgo cardiovascular, no modificó el status antioxidante ni marcadores de inflamación. No obstante, tras una ingesta aguda de Fibra Antioxidante de Uva se observó un aumento significativo de la capacidad antioxidante plasmática, lo que*

*indicaría por primera vez una absorción de los polifenoles presentes en un producto rico en fibra. Futuros trabajos son necesarios para establecer los parámetros más adecuados para estudiar el status antioxidante. La medida de capacidad antioxidante plasmática podría ser válida para ensayos de biodisponibilidad, pero limitada en ensayos de suplementación con antioxidantes durante periodos prolongados.*

- La Fibra Antioxidante de Uva resultó bien aceptada sensorialmente desde el punto de vista del color y del olor y no tanto respecto al sabor. La textura debería ser modificada para un posible uso comercial. En cualquier caso, se ha comprobado que 7,5 g/día de Fibra Antioxidante de Uva suponen una cantidad fácilmente incorporable a una dieta habitual y que podría reportar distintos efectos beneficiosos.*



## **4. CONCLUSIONES**

## **I. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes**

1) Los datos de capacidad antioxidante de alimentos disponibles en la literatura corresponden a medidas efectuadas en extractos acuoso-orgánicos. Sin embargo, la evaluación de la capacidad antioxidante global de alimentos debe considerar también la que se encuentra asociada a los residuos de dichas extracciones, dado que pueden contener una cantidad apreciable de antioxidantes biológicamente activos.

2) El disolvente de extracción, ciertos componentes no antioxidantes de los alimentos y el método de medida pueden afectar significativamente los valores de capacidad antioxidante. De los métodos ensayados (FRAP, ABTS, DPPH, ORAC), el ORAC es el que presenta más variabilidad en sus valores por estos factores. Sólo deberían ser válidas las comparaciones de capacidad antioxidante de alimentos determinadas utilizando el mismo disolvente de extracción y el mismo método de medida.

3) La mayor parte de los datos disponibles de capacidad antioxidante corresponden a medidas efectuadas a un tiempo fijo. La consideración de parámetros cinéticos puede proporcionar un conocimiento más completo del comportamiento de los antioxidantes. En este trabajo se aporta un procedimiento para la obtención de parámetros cinéticos en uno de los métodos más usados en la literatura para la evaluación de capacidad antioxidante: ABTS.

4) La evaluación de capacidad antioxidante realizada en extractos de alimentos obtenidos por tratamientos con enzimas digestivas puede proporcionar valores con mayor significancia fisiológica y nutricional que los obtenidos en extractos acuoso-orgánicos.

5) El elevado contenido en fibra de la Fibra Antioxidante de Uva y su alta capacidad antioxidante, asociada tanto al sobrenadante de extracción (efectuado con metanol/agua acidificado seguido de acetona/agua) como al correspondiente residuo, sugieren su potencial como ingrediente funcional.

## **II. Efectos de Fibra Antioxidante de Uva (ensayos clínicos)**

**6)** El alto estrés oxidativo en fumadores puede dificultar la observación de cambios en el status antioxidante tras una suplementación dietética. No se observaron cambios significativos en el status antioxidante ni en el perfil lipídico tras la ingesta por fumadores de 7,5 g/día de Fibra Antioxidante de Uva (FAU) durante un mes.

**7)** La medida de capacidad antioxidante en plasma (0 a 24 hs) tras la ingesta de alimentos o bebidas ricos en antioxidantes es una metodología utilizada con éxito en estudios de biodisponibilidad. El aumento significativo de capacidad antioxidante plasmática tras la ingesta de FAU (15 g) por voluntarios sanos indica, por primera vez, la biodisponibilidad de los antioxidantes asociados la Fibra Antioxidante de Uva.

**8)** La ingesta de 7,5 g/día de FAU durante 3,5 meses por sujetos normo- e hipercolesterolémicos redujo significativamente el colesterol total, colesterol LDL y el recuento de plaquetas. Este descenso fue más acusado en los sujetos hipercolesterolémicos, donde también se redujeron significativamente los triglicéridos.

**9)** La reducción de colesterol tras la ingesta de Fibra Antioxidante de Uva es superior a la de otras fibras de reconocido efecto hipocolesterolémico (psyllium y  $\beta$ -glucanos, de acuerdo con la FDA).

**10)** En el mismo ensayo, no se observaron variaciones significativas en el status antioxidante, lo que concuerda con los resultados publicados por otros autores tras ensayos similares. Esto sugiere que la medida de capacidad antioxidante plasmática como marcador de status antioxidante puede tener un valor limitado.

**11)** La ingesta de 7,5/ día de Fibra Antioxidante de Uva durante 3,5 meses produjo un aumento significativo del número de deposiciones en los participantes. Esto indica una doble acción – regulación del tránsito intestinal y efecto hipocolesterolémico- de la Fibra Antioxidante de Uva, de la que carecen otros suplementos dietéticos hipocolesterolémicos (por ejemplo, los fitosteroles).

**12)** Se observaron tendencias a la reducción de la tensión arterial tras la ingesta de 7,5 g/día de Fibra Antioxidante de Uva durante 3,5 meses por sujetos mayoritariamente normotensos. Son necesarios estudios específicos en individuos hipertensos para evaluar un posible efecto en este sentido.



## **5. BIBLIOGRAFÍA**



- Abdel-Aal ES & Hull P. "Amino acid composition and in vitro protein digestibility of selected ancient wheats and their end products". *Journal of Food Composition and Analysis*, 15 (2002) 737-47
- Abli H C & Meinders AE. "C-reactive protein: history and revival" *European Journal of Internal Medicine*, 13, 7 (2002) 412-22
- Adom KK & Liu RH. "Antioxidant activity of grains" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 6182-87
- Adom KK, Sorrells ME, Liu RH. "Phytochemicals profiles and antioxidant activities of wheat varieties" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 7825-34
- Aghdassi E, Allard JP. "Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions" *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 6 (2000) 880-86
- Akagawa M, Sasaki D, Kurota Y, Suyama K. "Formation of  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes in proteins by the Maillard Reaction." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043 (2005) 129-34
- Al-Awwadi NA, Bournet A, Azay J, Araiz Z, Delbosc S, Cristol JP, Linck N, Cros G, Teissedre PL. "Red wine polyphenols alone or in association with ethanol prevent hypertension, cardiac hypertrophy and production of reactive oxygen species in the insuline-resistant fructose-fed rats" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53,1 (2005) 151-57
- Alberg AJ. "The influence of cigarette smoking on circulating concentration of antioxidants micronutrients" *Toxicology*, 180,2 (2002) 121-37
- Alessio HM, Hegerman AE, Romanello M, Carando S, Threlked MS, Dimitrova Y, Muhammed S, Wiley RL. "Consumption of green tea protects rats from exercise-induced oxidative stress in kidney and liver" *Nutrition Research*, 22 (2002) 1177-88
- Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Trial Study Group. "The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers" *New England Journal of Medicine*, 330 (1994) 1029-35
- Ambring A, Johansson M, Axelsen M, Gan L, Strandvik B, Friberg P. "Mediterranean-inspired diet lowers the ratio of serum phospholipid n-6 to n-3 fatty acids, the number of leukocytes and platelets, and vascular endothelial growth factor in healthy subjects" *American Journal of Clinical Nutrition*, 83,3 (2006) 575-81
- Andreason MF, Kroon PA, Williamson G, García-Conesa MT. "Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids". *Free Radicals in Biology and Medicine*, 31 (2001) 304-14
- Armstrong E, Eastwood M, Brydon W. "The influence of wheat bran and pectin on the distribution of water in rat caecal contents and faeces" *British Journal of Nutrition*, 69 (1993) 913-20
- Arnao MB. "Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case" *Trends in Food Science and Technology*, 11 (2000) 419-21
- Arts MJTJ, Haenen G R M M, Voss H P & Bast A. "Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein" *Food and Chemical Toxicology*, 39 (2001) 787-91

- Arts M J T J, Voss H P, Haenen G R M M & Bast A. "Antioxidant Capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay" *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1 (2004a) 45-49
- Arts M J T J, Dallinga JS, Voss H P, Haenen G R M M & Bast A. "A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay". *Food Chemistry*, 88 (2004b) 567-70
- Aruoma OI. "Free radicals, antioxidants and international nutrition" *Asia and Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 8, 1 (1999) 53-63
- Aruoma OI. "Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods" *Mutation research*, 523-24 (2003) 9-20
- Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurrudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, Itoh H, Kasai H. "Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanosine, in a central site of the human lung" *Carcinogenesis*, 18,9 (1997) 1763-66
- Auger C, Caporiccio B, Landrault C, Teissedre PL, Laurent C, Cros G, Besancon P, Rouanet JM. "Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*)" *Journal of Nutrition*, 132 (2002) 1207-13
- Auger C, Gerain P, Laurent-Bichon F, Portet K, Bornet A, Caporiccio B, Cros G, Teissedre PL, Rouanet JM. "Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect" *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52 (2004) 5297-302
- Auger C, Rouanet JM, Vanderlinde R, Bornet A, Decorde K, Lequeux N, Cristol JP, Teissedre PL. "Polyphenols-enriched Chardonnay white wine and sparkling pinot noir red wine identically prevent early atherosclerosis in hamsters" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 9823-29
- Aukrust P, Luna L, Ueland T, Johansen RF, Muller F, Froland S, Seeberg EC, Bjorås M. "Impaired base excision repair and accumulation of oxidative base lesions in CD4+T cells of HIV infected patients" *Blood*, 105 (2005) 4730-35
- Avellone G, Di Garbo V, Campisi D, De Simone R, Raneli G, Scaglione R, Licata G. "Effects of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis" *European Journal of Clinical Nutrition*, 60, 1 (2006) 41-47
- Awika SM, Rooney LW & Waniska RD. "Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties" *Food Chemistry*, 90, 1-2 (2005) 293-31
- Bamonti F, Novembrino C, Ipolito S, Soresi E, Ciani A, Lonati S, Scurati-Manzoni E, Cighetti G. "Increased free malondialdehyde concentration in smokers normalise with a mixed fruit and vegetable juice concentrate: a pilot study" *Clinical Chemistry Laboratory medicine*, 44,4 (2006) 391-95
- Barclay L R C, Edwards CE, Vinquist MR. "Media effects on antioxidant activities of phenols and catechols". *Journal of the American Chemical Society*, 121 (1999) 6226-31
- Baublis A, Decker EA, Clydesdale FM. "Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals" *Food Chemistry*, 68 (2000) 1-6
- Beekwilder J, Jonker H, Meesters P, Hall RD, van der Meer IM & de Vos CHR. "Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 3313-20
- Benzie I F F & Strain J J. "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay". *Analytical Biochemistry*, 239 (1996) 70-76.

- Bernatova I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Sturtina S, Andriantsitohaina R. "Wine polyphenols improve cardiovascular remodelling and vascular function in NO-deficient hypertension" *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 282 (2002) 942-48
- Bompadre S, Leone L, Politi A, Battino M. "Improved FIA-ABTS method for antioxidant capacity determination in different biological samples" *Free Radical Research*, 38 ,8 (2004) 831-38
- Borrelli RC, Esposito F, Napolitano A, Fogliano V. "Characterization of a new potential functional ingredient" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52,5 (2004) 1338-43
- Bors W, Michel C, Saran M. "Inhibition of bleaching of the carotenoid crocin, a rapid test for quantifying antioxidant activity" *Biochimical and Biophysical Acta*, 196 (1984) 312-19
- Box JD. "Investigation on the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters" *Water Research*, 17 (1983) 511-25
- Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28 (1995) 25-30
- Bravo L, Mañas E, Saura-Calixto F. "Dietary non-extractable condensed tannins as indigestible compounds; effects on faecal weight, an protein and fat excretion" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63 (1993) 63-68
- Bravo L, Abia R, Saura-Calixto, F. "Polyphenols dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (1994) 1481-87
- Bratt K. "Avenanthramides in oats (*Avena sativa* L.) and structure-antioxidant activity relationships" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3 (2003) 594-600
- Briante R, Febraio F, Nucci R. "Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the Mediterranean diet" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 6975-81
- Brock DW, Davies CK, Irving BA, Rodriguez J, Barrett EJ, Weltman A, Taylor AG, Gaesser GA. "A high-carbohydrate, high-fiber meal improves endothelial function in adults with the metabolic syndrome" *Diabetes Care*, 29, 10 (2006) 2313-15
- Brown L, Rosner B, Willett WW, Sacks FM. "Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis" *American Journal of Clinical Nutrition*, 69 (1999) 30-42
- Bruno RS, Ramakrishnan R, Montine TJ, Bray TM, Traber MG. "α-tocopherol disappearance is faster in cigarette smokers and is inversely related to their ascorbic acid status" *American Journal of Clinical Nutrition*, 81,1 (2005) 95-103
- Cacetta RA, Burke V, Mori TA, Beilin LJ, Puddey IB, Croft KD. "Red wine polyphenols, in the absence of alcohol, reduce lipid peroxidative stress in smoking subjects" *Free Radicals in Biology and Medicine*, 30,6 (2001) 36-42
- Cao G. et al "Antioxidant capacity of tea and common vegetables" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (1996) 3426-31
- Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. "Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruits and vegetables" *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (1998) 1081-87
- Caliskan, S.; Kuralay, f.; Önvural, B. "Effect of anticoagulants on plasma homocysteine determination" *Clinica Chimica Acta*, 309 (2001) 53-56
- Castilla P, Echarri R, Davalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, Fernandez-Lucas M, Gomez-Coronado D, Ortuno J, Lasuncion MA. "Concentrated red grape juice exerts antioxidant

hypolipidemic and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects" *American Journal of Clinical Nutrition*, 84 (2006) 252-62

Castillejo G, Bulló M, Anguera A, Escribano J, Salas-Salvadó J. "A controlled, randomized, double-blind trial to evaluate the effect of a supplement of cocoa husk that is rich in dietary fiber on colonic transit in constipated pediatric patients" *Pediatrics*, 118,3 (2006) e461-e468

Chandalia M, Garg A, Lutjohann D, Bergman KV, Grundy SM, Brinkley LJ. "Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus" *New England Journal of Medicine*, 342 (2000) 1392-98

Chandrasekar D, Madhusudhana K, Ramakrishna S & Diwan PV. "Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: a sensitive screening method for polyherbal formulations" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40 (2006) 460-64

Chara H, Haga S, Aoyama K, Kiriya S. "Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine" *Journal of Nutrition*, 129 (1999) 942-48

Chen Z, Stini WA, Marshall JR, Martínez ME, Guillén-Rodríguez JM, Roe D, Alberts DS. "Wheat bran fiber supplementation and bone loss among older people" *Nutrition*, 20,9 (2004) 747-51

Chou EJ, Keevil JG, Aeschliman S, Wiebe DA, Folis JD, Stein JH. "Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease" *The American Journal of Cardiology*, 88,1 (2001) 533-35

Cighetti G, Debiassi S, Paroni R, Allevi P. "Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection" *Analytical Biochemistry*, 226 (1999) 222-29

Claeson Bohnstedt K, Karlberg B, Wahlund LO, Jönhagen ME, Basun H, Schmidt S. "Determination of isoprostanes in urine samples from Alzheimer patients using porous graphitic carbon liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Journal of Chromatography B*, 796,1 (2003) 11-19

Collins A et al. "Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications" *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30 (1997) 139-46

Collins A, Cadet J, Moller L, Poulsen HE, Viña J. "Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells?" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423, 1 (2004) 57-65

Daneshvar B, Frandsen H, Autrup H, Dragsted LO. "γ-Glutamyl semialdehyde and 2-amino-adipic semialdehyde: Biomarkers of oxidative damage to protein" *Biomarkers*, 2 (1997) 117-123

Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. "Extending applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) assay" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 48-54

Dapkevicius A, van Beek TA & Niederländer HAG. "Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates" *Journal of Chromatography A*, 912 (2001) 73-82

De la Fuente M. "Effects of antioxidants on immune system aging" *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (2002) Supplement 3: S5-8

Del Rio D, Stewart A, Pellegrini N. "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress" *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease*, 15, 4 (2005) 316-28

- Deng D, Zhang J, Cooney JM, Skinner MA, Adaim A, Jensen DJ, Stevenson DE. "Methylated polyphenols are poor "chemical" antioxidants but can still effectively protect cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity" *FEBS Letters*, 580 (2006) 5247-50
- De Pee S, West C, Permaesih D, Martuti S, Muhila L, Havtauast J. "Orange fruit is more effective than are dark-green leafy vegetables in increasing serum concentrations of retinol and beta-carotene in schoolchildren in Indonesia" *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (1998) 1058-67
- Díaz-Rubio ME & Saura-Calixto F. "Dietary fiber in wine" *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (2006) 69-72
- Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R. "Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation and induce gene expression" *Hypertension*, 38 (2001) 159-65
- Dietrich M, Block G, Hudes M, Morrow JD, Norkus EP, Traber MG, Cross CE, Packer L. "Antioxidant supplementation decreases lipid peroxidation biomarker F<sub>2</sub>-isoprostanes in plasma of smokers" *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 11,1 (2002) 7-13
- Djoussé L, Ellison C, McLennan CE, Cupples LA, Lipinska J, Tofler GH, Gokle N, Vita JA. "Acute effects of a high-fat meal with and without red wine on endothelial function in healthy subjects" *The American Journal of Cardiology*, 84, 15 (1999) 660-64
- Dragsted LO, Ravn-Haren G, Hansen M, Kall M, Breinholt V, Jakobsen J, Rasmussen SE, Pedersen A, Sandstrom B, Hermetter A, Basu S, Castenmiller J, Stagsted J, Skibsted LH, Loft S. "Reply to M. Serafini" letter to editor, *American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (2005) 532-34
- Drury JA, Nycyk JA & Cooke RW. "Pentane measurements in ventilated infants using a commercially available system". *Free Radicals in Biology and Medicine*, 22 (1997) 895-900
- Drury JA, Jeffers G, Cooke RW. "Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in infants and children". *Free Radical Research*, 28 (1998) 432-28
- Ducros V, Demuth K, Sauvante MP, Quillard M, Caussé E, Candito M, Read MH, Draï J, Garcia I, Gerhardt MF for the SFBC Working group on homocysteine. "Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results" *Journal of Chromatography B*, 781 (2002) 207-26
- Duncan MW. "A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine" *Aminoacids*, 25 (2003) 351-61
- El-Agamey A, Lowe GW, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ. "Carotenoid radical chemistry and antioxidant/prooxidant properties" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430 (2004) 37-48
- Emmons CL, Peterson D, Paul GL. "Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocopherol antioxidants" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1999) 4894-98
- Englyst HN, Cummings JH. "Improved method for the measurement of dietary fibre as non-starch polysaccharide in plant foods" *Journal of the Association Official of Analytical Chemistry*, 71 (1988) 808-14
- Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ. "Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 648-656
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Dieber-Rotheneder M. "Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein". *Free Radicals Research Communications*, 6 (1989) 67-75

- Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antunez E, Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Rotilio D, Gaetano G, Rubin E, Urbano-Marquez A. "Diferent effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomised crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers" *Atherosclerosis*, 175 (2004) 117-23
- Falchi M, Bertelli A, Lo Scalzo R, Morassut M, Morelli R, Das S, Cui J, Das K. "Comparison of cardioprotective abilities between the flesh and skin og frapes" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 6613-22
- Fermo, I.; Arcelloni, C.; Mazzola, G.; D'Angelo, A.; Paroni, R. "HPLC method for measuring total plasma homocysteine levels" *Journal of Cromatography B*, 719 (1998) 31-36
- Femenía-Ríos M, García-Pajón CM, Hernández-Galán R, Macías-Sánchez AJ, Collado IG. "Synthesis and free radical scavenging activity of a novel metabolite from the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*" *Bioorganic and Medicinal Chemsitry Letters*, 16, 22 (2006) 5836-39
- Fernández J, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López JA. "Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat" *Food Chemistry*, 59 (1997) 343-53
- Fernández-Pachón MS, Villaño D, García-Parrilla MC, Troncoso AM. "Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition" *Analytica Chimica Acta*, 513 (2004) 113-18
- Fogliano V, Verde G, Randazzo G, Ritieni E. "Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1999) 1035-40
- Foti MC, Dasquino C & Geraci C. "Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcohol solutions" *Journal of Organic Chemistry*, 69 (2004) 2309-14
- Frankel EN, Meyer AS. "Review. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (2000) 1925-41
- Frick B, Schröcksnadel K, Nerauter G, Wirleitner B, Artner-Dworzak E, Fuchs, D. "Rapid measurement of total plasma homocysteine by HPLC" *Clinica Chimica Acta*, 331 (2003) 19-23
- Frick B, Schröecksnadel K, Neurauter G, Leblhuber F, Fuchs D. "Increasing production of homocysteine and neopterin and degradation of tryptophan with older age" *Clinical Biochemistry*, 37,8 (2004) 684-87
- Frishman, W.H. "Biologic markers as predictors of cardiovascular disease" *The American Journal of Medicine*, 104, 6<sup>a</sup> (1998) 18S-27S
- Fuchs D, Werner ER, Eachter H. "Soluble products of inmune activation: neopterin" Chapter in "Manual of clinical laboratory immunology" Fourth edition. Editors: Rose NR, Conway de Macario E, Fahey JL, Friedman H, Penn GM. American Society for Microbiology, 1992, Washington D.C
- Fuchs D, Jaeger M, Widner B, Wirleitner B, Artner-Dworzak Leblhuber, F. "Is hyperhomocysteinemia due to the oxidative depletion of folate rather than to insufficient dietary intake?" *Clin. Chem. Lab. Med.*, 39, 8 (2001) 691-94
- Fukuda,T., Ito, H. and Yoshida, T. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* 63 (2003) 795- 801.
- Fung TT, Hu FB, Pérez-Jiménez F. "Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men" *Annals of Internal Medicine*, 134 (2001) 1115-19



Fung TT, Rimn EB, Spiegelman D, Riffai N, Tofler GH, Willett WC, Hu FB. "Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular risk" *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2001) 61-67

Gackowski D, Kowalewski J, Siomek A, Olinski R. "Oxidative DNA damage and antioxidant level: comparison among lung cancer patients, healthy smokers and nonsmokers" *International Journal of Cancer*, 114,1 (2005) 153-56

Galisteo M, Sanchez M, Vera R, Gonzalez M, Anguera A, Duarte J, Zarzuelo A. "A diet supplemented with husks of *Plantago ovata* reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension and obesity by affecting adinopectin and TNF- $\alpha$  in obese Zucker RATS" *Journal of Nutrition*, 135 (2005) 2399-404

Gedik CM, Boyle SP, Wood SG, Vaughan NJ, Collins AR. "Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage" *Carcinogenesis*, 23 (2002) 1441-46

Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Nazzini E, Ferro-Luzzi A. "A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capacity" *Free Radicals in Biology and Medicine*, 18 (1995) 29-36

González San José, M.J.;Muñiz Rodríguez, P.; Valls Bellés, V. "Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo" *Centro de Información Cerveza y Salud*, 2001, Madrid

Goñi I, Serrano J. "The intake of dietary fiber from grape seeds modifies the antioxidant status in rat cecum" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (2005) 1877-81

Goñi I, Brenes A, Centeno C, Viveros A, Saura-Calixto F, Rebole A, Arijia I, Estévez R. "Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens" *Poultry Science*, 86,3 (2007) 508-16

Goode HF, Richardson N, Myers DS, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. "The effect of anticoagulant choice on apparent total antioxidant capacity using three different methods" *Annals of Clinical Biochemistry*, 32, 4 (1995) 314-16

Goodrich ME, Cumming RG, Mitchell P, Koutts J, Burnett L. "Plasma fibrinogen and other cardiovascular disease risk factors and cataract" *Ophthalmic Epidemiology*, 6,4 (1999) 276-90

Gorinstein S, Leontowicz H, Lojek A, Leontowicz M, Clz M, Krzeminsli R, Gralak M, Czerwinski J, Jastrzebski Z, Trakhtenberg S, Grigelmo MN, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. "Olive oil improves lipid metabolism and increases antioxidant potencial in rats fed diets containing cholesterol" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 6102-08

Gray DA, Clarke MJ, Baux C, Bunting JP, Salter AM. "Antioxidant activity of oat extracts added to human LDL particles and in free radical trapping assays" *Journal of Cereal Science*, 36 (2002) 209-18

Hakim IA, Harris RB, Chow HHS, Dean M, Brown S, Ali IU. "Effect of a 4-months tea intervention on oxidative DNA damage among heavy smokers: role of glutathione S-transferase genotypes" *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 13, 2 (2004) 242-49

Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OL. "The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals" *Analytical Biochemistry*, 15, 1 (1987) 215-19

Hakim IA, Harris RB, Chow HHS, Dean M, Brown S, Ali IU. "Effect of a 4-month tea intervention on oxidative DNA damage among heavy smokers: role of glutathione S- transferase genotypes" *Cancer Epidemiological Biomarkers and Prevention*, 13,2 (2004) 242-49

Halliwell, B. & Gutteridge,J.M. "Free radicals in biology and medicine", segunda edición. Oxford University Press, 1989, Nueva York

Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. "Free radicals and antioxidants in vivo: what they do and how they work" *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 35 (1995) 7-20

Handelman GJ, Cao G, Walter MF, Nightingale ZD, Paul GL, Prior RL, Blumberg J B. "Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1999) 4888-93

Hartzfeld PW, Forkner R, Hunter DM, Hagerman AE. "Determination of hydrolysable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 1785-90

Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. "Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation" *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17 (1997) 2744-52

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships" *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (2002) 572-84

Helmersson J, Larsson A, Vessby B, Basu C. "Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F<sub>2α</sub>, interleukin-6 and F<sub>2</sub>-isoprostane formation in elderly men" *Atherosclerosis*, 181, 1 (2005) 201-07

Herfieri I, Grelbeger J, Ledinsky G, Widner B, Fuchs D, Jürgens G. "Neopterin and 7,8-dihydroneopterin interfere with low density lipoprotein oxidation mediated by peroxynitrite and/or copper" *Free Radical Research*, 36 (2002) 509-20

Holmes VA, Young IS, Maresh MJA, Pearson DWM, Walker JD, McCance DR, on behalf of the DAPIT study group. "The diabetes and pre-eclampsia intervention trial" *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 87 (2004) 66-71

Horayama O. et al "Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence" *Analytical Biochemistry*, 247 (1997) 237-41

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. "High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 4337-44

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. "Development and validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002b) 1815-21

Huang D, Ou B, Prior RL. "The chemistry behind antioxidant capacity assays" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 1841-56

Hurtado P, Caldú A, Gonzalo JM, Ramon S, Mínguez, Fiol C "Antioxidative capacity of wine on human LDL oxidation *in vitro*: effect of skin contact in winemaking of white wine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (1997) 1283-1289

Ikawa M, et al. "Utilization of Folin-Ciocalteu reagent for the detection of certain nitrogen compounds" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 1811-15

Iriti M & Faoro F. "Grape phytochemicals: A bouquet of old and new nutraceuticals for human health" *Medical Hypotheses*, 67, 4 (2006) 833-38

- Iqbal S, Bhanger MI, Anwar F. "Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan" *Food Science and Technology*, 40, 2 (2007) 361-67
- Jacobs ET, Giuliano AR, Roe DJ, Guillén-Rodríguez JM, Hess LM, Alberts DS, Martínez ME. "Intake of supplemental and total fiber and risk of colorectal adenoma recurrence in the wheat bran fiber trial" *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 11, 9 (2002) 906-14
- Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Sánchez-Moreno C, Saura-Calixto F. "Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl" *Journal of Science of Food and Agriculture*, 80 (2000) 1686-90
- Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Pulido R, Saura-Calixto F. "Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 5 (2001) 530-34
- Kamanl A, Naziroglu M, Aydilek N, Hacievliyagil C. "Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis" *Cell Biochemistry and Function*, 22,1 (2003) 53-57
- Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. "Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation" *Journal of Nutrition*, 130, 1 (2000) 53-56
- Kim SH, Kim JS, Shin HS, Keen CL. "Influence of smoking on markers of oxidative stress and serum mineral concentrations in teenage girls in Korea" *Nutrition*, 19, 3 (2003) 240-43
- King DE. "Dietary fiber, inflammation and cardiovascular disease" *Molecular Nutrition and Food Research*, 49 (2005) 594-600
- Kirschbaum B. "Total urine antioxidant capacity" *Clinica Chimica Acta*, 305 (2001) 167-73
- Klaunig JE, Xu Y, Han C, Kamendulis LM, Chien J, Heiser C, Gordon MS, Mohler ER. "The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers" *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 220,4 (1999) 249-54
- Kleinveld HA, Hak-Lemmers HLM, Stalenhoef AFH, Demacker PNM. "Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein". *Clinical Chemistry*, 38 (1992) 2066–2072.
- Kneepkens CM, Lepage G & Roy CC. "The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation" *Free Radicals in Biology and Medicine*, 17 (1994) 127-60
- Kooy NWR, Ischiropoulos H, Beckman JS. "Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorodamine 123" *Free Radicals in Biology and Medicine*, 20 (1994) 594-606
- Labrinea EP, Georgiou A. "Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay" *Analytica Chimica Acta*, 526 (2004) 63-68
- Lamuela-Raventós R M, Waterhouse A L. "A direct HPLC separation of wine phenolics". *American Journal of Enology and Viticulture*, 45 (1994)1-5.
- Langman, LJ & Cole DE. "Homocysteine: cholesterol of the 90s?" *Clinica Chimica Acta*, 286, 1-2 (1999) 63-80
- Larrauri JA, Sánchez-Moreno C, Saura-Calixto F. "Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels " *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 7 (1998) 2694-97
- Lauridsen, ST & Mortensen A. "Probucol selectively increases oxidation of atherogenic lipoproteins in cholesterol-fed mice and in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits" *Atherosclerosis*, 142 (1999) 169-78

Lecumberri E, Goya L, Mateos R, Alía M, Ramos S, Izquierdo-Pulido M, Bravo L. "A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats" *Nutrition*, 23,4 (2007) 332-41

Lee CYJ, Jenner AM, Halliwell B. "Rapid preparation of human urine and plasma samples for analysis of F2-isoprostanes by gas chromatography- mass spectrometry" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330 (2004) 696-702

Lee W, Min WK, Chun S, Lee Yw, Park H, Lee DH, Lee Yk, Son JE. "Long-term effects of green tea ingestion on atherosclerotic biological markers in smokers" *Clinical Biochemistry*, 38,1 (2005) 84-87

Lemanska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zielinski R, Soffers, A E M F & Rietjens I M C M. "The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones" *Free Radicals Biology and Medicine*, 31, 1 (2001) 869-81

Lengger C, Schöch G, Topp H. "A high-performance liquid chromatographic method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine for man and rat" *Analytical Biochemistry*, 287,1 (2000) 65-72

Lieber CS. "Alcohol and the liver". *Molecular medicine: the molecular pathology of alcoholism*, editor: Palmer TN, Oxford University Press, Oxford, UK (1991), pp. 60–129.

Lima M J R, Ildikó V T, Rangel A O S S. "A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity". *Talanta*, 68 (2006) 207-13

Liu CS, Chiang TH, Kuo CL, Lii CK, Ou CC, Wei YH, Chen HW. "α-tocopherol is important to inhibit low-density lipoprotein oxidation in smokers" *Nutrition Research*, 24,5 (2004) 361-71

Liyana-Pathirana C, Shahidi F. "Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology" *Food Chemistry*, 93,1 (2005) 47-56

Llobera A & Cañellas J. "Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem" *Food Chemistry*, 101 (2007) 659-66

Lock K, Pomerleau J, Causer L, Altman DR, McKee M. "The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet" *Bulletin of the World Health Organization*, 83 (2005) 100-08

López M et al "Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method" *Talanta*, 60 (2003) 609-16

López-García E; Schulze MB; Fung TT, Meigs JB, Rifai N, Manson JE, Hu FB "Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction" *American Journal of clinical Nutrition*, 80 (2004) 1029-35

Ma Y, Griffith JA, Chasan-Taber L, Olendzki B, Jackson E, Stanek III EJ, Li W, Pagoto SL, Kafner AR, Ockene IS. "Association between dietary fiber and serum C-reactive protein" *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 4 (2006) 760-66

MacKay J, Mensah GA, Mendis S, Greenland K. "The atlas of Heart disease and stroke" Genova, World Health Organization, 2004

MacLean DD, Murr P, DeEll JR. "A modified total oxyradical scavenging capacity assay for antioxidants in plant tissues" *Postharvest Biology and Technology*, 29, 2 (2003) 183-94

Manson JE, Tosteson H, Ridker PM, Satterfield S, Hebert P, O'Connor GT, Buring JE, Hennekens CH. "The primary prevention of myocardial infarction" *New England Journal of Medicine*, 326 (1992) 1406-16

Mantle D Et al "Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils" *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 121 (1998) 385-91

Mañas E, Saura-Calixto F. "Ethanol precipitation: a source or error in dietary fibre determination" *Food Chemistry*, 47 (1993) 351-55

Mañas E, Bravo L, Saura-Calixto F. "Sources of error in dietary fibre analysis" *Food Chemistry*, 50 (1994) 331-42

Martin-Carrón N, Goñi I, Larrauri JA, Garcia-Alonso A, Saura-Calixto F. "Reduction in serum total and LDL cholesterol concentrations by a dietary fiber and polyphenol-rich grape products in hypercholesterolemic rats" *Nutrition Research*, 19, 9 (1999) 1371-81

Martín-Carrón N, Saura-Calixto F, Goñi I. "Effects of dietary fibre and polyphenol-rich grape products on lipidaemia and nutritional parameters in rats" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (2000) 1183-88

Mateos R, Bravo L. "Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecule (DNA, lipids and proteins)" *Journal of Separation Science*, 30 (2007) 175-91

McNaulty SR, McNaulty LA, Morrow JD, Khardouni D, Shooter L, Monk J, Gross S, Brown V. "Effect of daily fruit ingestion on angiotensin converting enzyme activity, blood pressure, and oxidative stress in chronic smokers" *Free Radical Research*, 39,11 (2005) 1241-48

Metin Donma M, Donma O. "Phytonutrient and children: the other side of the medallion" *Food Research International*, 38 (2005) 681-92

Miekisch W, Schubert JK, Noelde-Schomburg GFE. "Diagnostic potential of breath analysis-focus on volatile organic compounds" *Clinica Chimica Acta*, 347, 1/2 (2004)

Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates" *Clinical Science*, 84 (1993) 407-12

Minniti G, Piana A, Armani U, Cerone R. "Determination of plasma and serum homocysteine by HPLC with fluorescence detection" *Journal of Chromatography A*, 828 (1998) 401-05

Miyagi K, Miwa K, Inoue H. "Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice" *The American Journal of Cardiology*, 80 (1997) 1627-31

Moschandreas J, Vissers MN, Wiseman S, Van Putte KP, Kafatos A. "Extra virgin olive oil phenols and markers of oxidation in Greek smokers: a randomized cross-over study" *European Journal of Clinical nutrition*, 56,10 (2002) 1024-29

Mukhopadhyay S, Luthria D L & Robbins R J. "Optimization of extraction process for phenolic acids from cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (2006) 156-62

Murr C, Baier-Bitterlich G, Fuchs D, Werner ER, Esterbauer H, Pfeiderer W, Wachter H. "Effects of neopterin-derivatives on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -induced luminal chemiluminescence: mechanistic aspects" *Free Radical Biology & Medicine*, 21,4 (1996) 449-56

Murr C, Fuith LC, Wiedner B, Wirleitner B, Fuchs D. "Review: increased neopterin concentrations in patients with cancer: indicator of oxidative stress?" *Anticancer Research*, 19 (1999) 1721-28

Murr C, Wiedner B, Wirleitner B, Fuchs D. "Neopterin as a marker for immune system activation" *Current Drug Metabolism*, 3 (2002) 175-87

- Naczek M & Shahidi F. "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 5 (2006) 1523-42
- Nam SH, Chui SP, Kang MY, Kozung N, Friedman M. "Antioxidative, antimutagenic and anticarcinogenic activities of rice bran extractions in chemical and cell assays" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 816-22
- Nam SH, Chui SP, Kang MY, Koh HJ, Kozukue N, Friedman M. "Antioxidant activities of oat bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars" *Food Chemistry*. In press
- Napolitano A, Lanzuise S, Ruocco M, Arlotti G, Rainieri R, Halvor Knutsen S, Lorito M, Fogliano V. "Treatment of cereal products with a tailored preparation of *Trichoderma* enzymes increases the amount of soluble dietary fiber" *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54 (2006) 7683-89
- Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. "Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 5735-41
- Naumann E, Van Rees AB, Onning G, Oste R, Wydra M, Mensink RP. "β-glucan incorporated into a fruit drink effectively lowers serum LDL-cholesterol concentrations" *American Journal of Clinical Nutrition*, 83 (2006) 601-05
- Nekrasova O, Lawrence NS, Compton RG. "Analytical determination of homocysteine: a review" *Talanta*, 60 (2003) 1085-95
- Neurauter G, Wirleitner B, Schröcksnadel K, Schennach H, Fuchs D. "Wine and grape juice modulate interferon gamma-induced neopterin production and tryptophan degradation in human PBMC" *Pteridines*, 15 (2004) 1-9
- Niki E. "Antioxidant activity: are we measuring it correctly?" *Nutrition*, 18, 6 (2002) 524-25
- Nordin-Fridriksson, G et al "Association between diet, lifestyle, metabolic cardiovascular risk factor and plasma C-reactive protein levels" *Metabolism*, 53, 11 (2004) 1436-42
- Northrop-Clewes LA & Thurnham DI. "Monitoring micronutrients in cigarette smokers" *Clinical Chemistry Acta*, 377, 1/2 (2007) 14-38
- O'Byrne DJ, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. "Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and α-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults" *American Journal of Clinical Nutrition*, 76 (2002) 1367-74
- Ordoudi SA, Tsimidou MA. "Crocetin bleaching assay step by step: observations and suggestions for an alternative validated protocol" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 1663-71
- O'Reilly JD, Mallet AI, McAnlis GT, Young IS, Halliwell B, Sanders TAB, Wiseman H. "Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F2-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans" *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2001) 1040-44
- Oshaug A, Bjorndal CH, Bugge KH, Trygg KU. "Tobacco smoking, an independent determinant for unhealthy diet? A cross-sectional study of Norwegian workers on platforms in the North sea" *European Journal of Clinical Nutrition*, 6,3 (1996) 196-202
- Osman HE, Maalej N, Shanmuganayagam D, Folts JD. "Grape juice, but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*)" *Journal of Nutrition*, 128, 12 (1998) 2307-12

- Osman AM, Wong KKY, Hill SJ, & Fernyougha A. "Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340,2 (2006) 597-603
- Osman AM, Wong KKY, Fernyhough A. "ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346 (2006) 321-29
- Ou B, Hampsch- Woodill M, Prior RL. "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 4619-26
- Ou B Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. "Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 3122-28
- Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalter B, Bartsch H. "Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene" *Food Chemical and Toxicology*, 38 (2000) 647-59
- Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP, Goldberg DM. "Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects" *Clinica Chimica Acta*, 246, 1/2(1996) 163-82
- Pal S, Naissides M, Mamo J. "Polyphenolics and fat absorption" *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 28 (2004) 324-26
- Pannala A, Razaq R, Halliwell B, Singh S & Rice-Evans C. "Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: Nitration or electron donation?" *Free Radicals in Biology and Medicine*, 24 (1998) 594-606
- Pannala AS, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA. "Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics" *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 282 (2001)1161-68
- Pedrielli, P., Pedulci, G.F., Skibsted, L.H. "Antioxidant mechanism of flavonoids. Solvent effect on rate constant for chain-breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 4 (2001) 3034-40
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. "Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays" *Journal of Nutrition*, 133 (2003) 2812-19
- Pellegrini N, Serafini M, Salvatore S, Del Rio D, Bianchi M, Brighenti F. "Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays" *Molecular Nutrition and Food Research*, 50,11 (2006) 1030-38
- Peoples MC & Karnes HT. "Recent development in analytical methodology for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and related compounds" *Journal of Chromatography B*, 15 (2005) 5-15
- Pereira MA, O'Reilly E, Augustsson K, Fraser GE, Goldbourt U, Heimann BL, Hallman G, Krekt P, Liu S, Pietinen P, Spiegelman D, Stevens J, Virtamo J, Willett WC, Ascherio A. "Dietary fiber and risk of coronary heart disease" *Archives of Internal Medicine*, 23 (2004) 370-76
- Pérez-Olleros L, García-Cuevas M, Ruiz-Roso B, Requejo A. "Comparative study of natural carob fibre and psyllium husk in rats. Influence on some aspects of nutritional utilisation and lipidaemia" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 (1999a) 173-78
- Pérez-Olleros L, García-Cuevas M, Ruiz-Roso B. "Influence of pulp and natural carob fiber on some aspects of nutritinal utilisation and lipidaemia" *Food Science Technology*, 5 (1999) 425-30

- Peterson D M. "Oat antioxidants. Mini review" *Journal of Cereals Chemistry*, 33 (2001) 115-29
- Peterson DM, Mahn MJ, Emmons CL. "Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities in vitro" *Food Chemistry*, 79 (2002) 473-78
- Pignatelli P, Ghiselli A, Buchetti B, Carnevale R, Natella F, Germano G, Fimognari F, Di Santo S, Lenti F, Violi F. "Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine" *Atherosclerosis*, 188 (2006) 77-83
- Pilz J, Meineke I, Gleiter CH. "Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative" *Journal of Chromatography B*, 742 (2000) 315-25
- Pinelo, Manzocco L, Núñez MJ, Nicoli MC. "Solvent effect on quercetin antioxidant capacity" *Food Chemistry*, 88,2 (2004) 201-07
- Pinto PAG, Saraiva LMFS, Reis S, Lima JLFC. "Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and evaluation of the antioxidant potential by the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay in wines by sequential injection analysis". *Analytica Chimica Acta*, 531 (2005) 25-32
- Pirisi M et al "Effect of eating on plasma Radical-Trapping Antioxidant Activity (TRAP) in patients with cirrhosis" *Clinical Biochemistry*, 32, 6 (1999) 447-53
- Prior RL, Cao G "In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods" *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 11/12 (1999) 1173-81
- Prior RL, Wu X, Schaich K "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10 (2005) 4290-302
- Proxky L, Asp NG, Schweizer TF, Devries JW, Furda IJ. "Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: collaborative study" *Journal of the Association Official of Analytical Chemistry*, 75 (1992) 360-67
- Pulido R, Bravo L & Saura-Calixto F. "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay" *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48 (2000) 3396-3402
- Pulido R. "Metodología para la determinación del estado antioxidante. Aplicación a estudio de efectos in vivo de la ingesta de antioxidantes naturales". Tesis doctoral. Departamento de Química Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 2003
- Pulido R, Hernández-García R, Saura-Calixto F. "Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet". *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(2003) 127-32
- Raederstoff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P. "Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats" *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14 (2003) 326-32
- Re R, Pellegrini N, Preoteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 9/10 (1999) 121-37
- Reed J, McDowell RE, Van Soest PJ, Horvath PJ. "Condensed tannins: a factor limiting the use of cassava forage" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33 (1982) 213-220
- Rebelo JA, Piedade JAP, Oliveira-Brett AM. "Development of an HPLC method with electrochemical detection of femtomoles of 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in the presence of uric acid" *Talanta*, 63 (2004) 323-31



- Renaud S, De Lorgeril M. "Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease" *Lancet*, 339 (1992) 1523-26
- Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. "Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl-products of metal-catalyzed oxidation of proteins" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98 (2001) 69-74
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids" *Free Radical of Biology and Medicine*, 20, 7 (1996) 933-56
- Roberts WG, Gordon GH, Walker AF. "Effects of enhanced consumption of fruit and vegetables on plasma antioxidant status and oxidative resistance of LDL in smokers supplemented with fish oil" *European Journal of Clinical Nutrition*, 57 (2003) 1303-10
- Roura E, Andrés-Lacueva C, Estruch R, Lamuela-Raventós RM. "Total polyphenol intake estimated by a modified Folin-Ciocalteu assay of urine" *Clinical Chemistry*, 52,4 (2006) 749-52
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas Jr DJ. "Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study" *Fertility and Sterility*, 78,3 (2002) 491-99
- Salmeron J, Manson JE, Stampfer MJ et al. "Dietary fibre, glycemic load and risk of non-insulin dependent diabetes mellitus in woman" *Journal of the American Medical Association*, 277 (1997) 472-77
- Santos-Buelga, C. & Scalbert, A. "Proanthocyanidins and tannin-like compounds- nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (2000)1094-1117
- Sánchez-González I, Jiménez-Escrig A & Saura-Calixto F. "In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter)" *Food Chemistry*, 90, 1/ 2 (2005) 133-39
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (1998) 270-76
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. "Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 10 (1999) 1301-04
- Sánchez-Moreno C, Jiménez-Escrig A., Saura-Calixto, F. " Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols" *Nutrition Research*, 20 (2000) 941-53
- Sánchez-Moreno C. "Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems" *Food Science and Technology International*, 8, 3 (2002) 121-39
- Saura Calixto F & Goñi Cambrodón I. "Functional formulation based on antioxidant dietary fiber and soluble fiber" *Patente CSIC-UCM*, ES 2259258 A1
- Saura-Calixto F & Larrauri García JA. "Concentrado de fibra dietética natural de uva y su procedimiento de obtención" *Patente CSIC ES* 2130092 A1
- Saura-Calixto F. "La fibra dietética en nutrición y salud" *Alimentación, Nutrición y Salud*, 4, 1 (1997) 17-20
- Saura-Calixto F, García-Alonso A, Goñi I, Bravo L."In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis"*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 3342-47

- Saura-Calixto F & Goñi I. "The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies" *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, 7 (2004) 1078-82
- Saura-Calixto F & Goñi I. "Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet" *Food Chemistry*, 94 (2006) 442-47
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. "Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet" *Food Chemistry*, 101, 2 (2007) 492-501
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. "Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet" *Food Chemistry*, 101,2 (2007) 492-501
- SchroECKSnadel K, Frick B, Winkler C, Leblhuber F, Wirleitner B, Fuchs D. "Hyperhomocysteinemia and immune activation" *Clin. Chem. Med. Lab.*, 41, 11 (2003) 1438-43
- SchöECKSnadel K, Frick B, Fuchs D. "Serum homocysteine and endothelial dysfunction to the circulatory disorders in women" *Circulation*, 110 (2004) e37
- SchöECKSnadel K, Winkler C, Fuith LC, Fuchs D. "Tryptophan degradation in patients with gynaecological cancer correlates with immune activation" *Immune letters*, 223,2 (2005) 323-29
- SchröECKSnadel K, Winkler C, Duftner C, Wirleitner B, Schirmer M, Fuchs D. "Tryptophan degradation increases with stage in patients with rheumatoid arthritis" *Clinical Rheumatology*, 25,3 (2006) 334-37
- Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzi A. "Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans" *Journal of Nutrition*, 128 (1998) 1003-07
- Serafini M, et al "Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans" *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11 (2000) 585-9
- Serafini M, Del Rio D, Crozier A, Benzi IFF. "Effect of changes in fruit and vegetable intake on plasma antioxidant defenses in humans" *Letter to the Editor, American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (2005) 531-32
- Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F. "Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity" *Food Research Internacional*, 40, 1 (2007) 15-21
- Serrano J. "Disponibilidad intestinal de compuestos bioactivos de la dieta (polifenoles y carotenoides)" *Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología I, Facultad de Farmacia, UCM, 2005*
- Shai I, Stampfer MJ, Mab J, Manson JE, Hankinson SE, Cannuscio C, Selhub J, Curhan G, Rimm EB. "Homocysteine as a risk factor for coronary heart diseases and its association with inflammatory biomarkers, lipids and dietary factors" *Atherosclerosis*, 177 (2004) 375-81
- Shanmuganayagam D, Beahm MR, Osman HE, Krueger CK, Reed JD, Folts JD. "Grape seed and grape skin extracts elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individually in dogs and in humans" *Journal of Nutrition*, 132 (2002) 3592-98
- Shrikhande AJ. "Wine by-products with health benefits" *Food Research Internacional*, 33,6 (2000) 469-74
- Simonetti P, Ciapellano S, Gardana C, Bramati L, Pietta P. "Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds: in vivo effects on oxidative stress" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 6217-21

- Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent" *Methods of Enzymology*, 299 (1999) 152-78
- Siquet C, Paiva-Martins F, Lima JLFC, Reis S, Borges F. "Antioxidant profile of dihydroxy-and trihydroxyphenolic acids- A structure-activity relationship study" *Free Radical Research*, 40 (2006) 433-42
- Soares de Moura R, Costa Viana FS, Souza MAU, Kuvary H, Guedes DC, Oliveira EPB, Rubenich LMS, Carvalho LLRM, Oliveira RM, Tano T, Gusmao Correia ML. "Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract" *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 54 (2002) 1515-20
- Spencer J, Chaudry F, Pannala A, Srai S, Debnam E, Rice-Evans C. "Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272 (2000) 236-41
- Stahl W & Sies H. "Bioactivity and protective effects of natural carotenoids" *Biochemical and Biophysical Acta*, 1740 (2005) 101-07
- Stanner S, Hughes J, Buttriss J. "A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis" *Public Health Nutrition*, 7, 3 (2004) 407-22
- Streppel MT, Arends LR, Van't Veer P, Grobbee DE, Geitjns JM. "Dietary fiber and blood pressure" *Archives of Internal Medicine*, 165 (2005) 150-56
- Suttnar J, Masova L, Dyr JE. "Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde" *Journal of Chromatography B*, 751, 1 (2001) 193-97
- Tagesson C, Källberg M, Klintonberg C, Starkhammar H. "Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography: a powerful technique for assaying in vivo oxidative DNA damage in cancer patients" *European Journal of Cancer*, 31,6 (1995) 934-40
- Torres JL, Lozano C, Julia L, Sánchez-Baeza FJ, Anglada JM, Centelles JJ, Cascantes JM. "Cysteineyl-flavan-3-ol conjugates from grape procyanidins. Antioxidant and antiproliferative properties" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10 (2002) 2497-2509
- Trevisan MTS, Pfundstein B, Haubner R, Würtele G, Spieglehalder B, Batsch H, Owen RW. "Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity" *Food and Chemical Toxicology*, 44, 2 (2006) 188-97
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. "Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population" *New England Journal of Medicine*, 348 (2003) 2599-2608
- Tsikas D, Caidahl N. "Recent methodological advances in the mass spectrometric analysis of free and protein associated 3-nitrotyrosine in human plasma" *Journal of Chromatography B*, 814 (2005) 1-9
- Tucker JM, Townsend DM. "Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease" *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59, 7 (2005) 380-87
- Tunpipoipat S, Judprasong K, Zeder C, Wasantwisut E, Winichagoon P, Charoenkiatkul S, Hurrell R, Walczyk T. "Chili, but not turmeric, inhibits iron absorption in young-women from an iron fortified composite meal" *Journal of Nutrition*, 136,12 (2006) 2970-74
- Valgimigli L, Ingold K, Lusztyk J, Banks J. "Solvent effects on the antioxidant activity of vitamin E" *Journal of Organic Chemistry*, 64,9 (1999) 3381-83

Valls, V. "Presencia y actividad funcional de los polifenoles en alimentos y bebidas" Capítulo en "Actualización en nutrición 2005. Evidencias en nutrición" Editores: Iglesias Rosado, C. & Román Martínez, J. Sanitaria 200, 2005, Madrid

Valls Bellés, V.; Codoñer Franch, P.; González San-José, M.L.; Muñiz Rodríguez, P. "Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. Efecto antioxidante "in vivo" Centro de Información Cerveza y Salud, 2005, Madrid

Van den Berg R, Van Vliet T, Broekman WMR, Cnubben HP, Vaes WHJ, Roza L, Haenen GRMM, Bast A, Van der Berg H. "A vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers" *Journal of Nutrition*, 131 (2001) 1714-22

Vanizor Kural, B. Et al "Plasma homocysteine and its relationships with atherotrombotic markers in psoriatic patients" *Clinica Chimica Acta*, 332, 1/2 (2003) 23-30

Vergara-Valencia N, Granados-Pérez A, Agama-Acevedo E, Touvar J, Ruales J, Bello-Pérez A. "Fibre concentrate from mango fruit: Characterization, associated antioxidant capacity and application as a bakery product ingredient" *Food Science and Technology*, 40, 4 (2007) 722-29

Vicent-Baudry, S., Deffort., C. et al. "The MEDI-Rivage study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-month intervention with a Mediterranean-type diet or a low fat diet" *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 5 (2005) 964-71

Villaño D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC. "The antioxidant activity of wines determined by the ABTS <sup>••</sup> method: influence of sample dilution and time" *Talanta*, 64 (2004) 601-09

Villaño D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC. "Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro" *Analytica Chimica Acta*, 538 (2005) 391-98

Vinson JA, Proch J, Bosé R. "Determination of quantity and quality of polyphenols antioxidants in foods and beverages" *Methods in Enzimolgy*, 335 (2001) 103-14

Visciti K, Dougherty MP, Briggs J, Camire ME. "Complex Phenolic compounds reduce lipids oxidation in extruded oat cereals" *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37 (2004) 789-96

Vigna GB, Constantini F, Aldini G, Carini M, Catapano A, Schena F, Tangerini A, Zanca R, Bombardelli E, Morazzoni P. "Effect of a standardized grape seed extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers" *Metabolism*, 52 (2003) 1250-57

Wallerath T, Poleo D, Li h, Forstermann V. "Red wine increases the expression on human endothelial nitric oxide synthase" *Journal of the American College of Cardiology*, 41,3 (2003) 471-78

Wang H, Cao G, Prior RL. "Total antioxidant capacity of fruits" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (1996) 701-05

Ward NC, Hodgson JM, Croft KD, Burke V, Beilin LJ, Pudney IB. "The combination of vitamin C and grape-seed polyphenols increases blood pressure: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial" *Journal of Hypertension*, 23 (2005) 427-34

Washington N, Harris M, Musselwhite A, Spiller RC. "Moderate lactulose-induced diarrhea by psyllium: effects on motility and fermentation" *American Journal of Clinical Nutrition*, 67 (1998) 317-21

Weikert C, Hoffman K, Dierkes J, Zyriax BC, Klipstein-Grobusch K, Schulze MB, Jung R, Windler E, Boeing H. "A homocysteine metabolism-related dietary pattern and the risk of

coronary heart disease in two independent German study populations" *Journal of Nutrition*, 135 (2005) 1981-88

Weinlich G, Murr C, Richardsen L, Winkler C, Fuchs D. "Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients" *Dermatology*, 214, 1 (2006) 8-14

Widner B, Werner ER, Schennach H, Wachter H, Fuchs D. "Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by HPLC" *Clinical Chemistry*, 43, 12 (1997) 2424-26

Widner B, Baier-Bitterlich G, Wede I, Wirleitner B, Fuchs D. "Neopterin derivatives modulate the nitration of tyrosine by peroxynitrite" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 248 (1998) 341-46

Wilson R, Lyall C, Smyth L, Fernie CE, Riemersma RA. "Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of 'oxidative stress' in vivo " *Free Radicals in Biology and Medicine*, 32,2 (2002) 162-68

Winston GW, Regoli F, Dugas AJ Jr, Fong JH, Blanchard KA. "A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids" *Free Radicals in Biology and Medicine*, 24 (1998) 480-93

Wirleitner B, Schröcksnadel, Winkler C, Frick B, Fuchs D. "In vivo determination of oxidative stress" *Aktuel. Ermaehr. Med.*, 28 (2003) 363-70

Wirleitner B, Schröcksnadel, Winkler C, Frick B, Fuchs D. "Interferon-gamma induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects" *Current Medicinal Chemistry*, 10 (2003) 1581-91

Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Moschen AR, Kaser A, Obrist P, Fuchs D, Brandacher G, Winkler C, Geboes K, Rutgeerts P, Tilg H. "Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease" *Clinical Immunology*, 113, 1 (2004)

Woodside JV, Young IS, Yarnell JWG et al. "Antioxidants but not B-group vitamins increase the resistance of low-density lipoprotein to oxidation: a randomized, factorial design, placebo-controlled trial" *Atherosclerosis*, 144 (1999) 419-27

Woodside JV, McCall D, McGartland C, Young IS. "Micronutrients: dietary intake vs. supplement use" *Proceedings of the Nutrition Society*, 64 (2005) 543-53

Woodside JW, Campbell MJ, Denholm EE, Newton L, Honour IW, Morton MS, Young IS, Leatham AIC. "Short-term phytoestrogen supplementation alters insulin-like growth factor profile but not lipid or antioxidant status" *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17 (2006) 211-15

Wu LL, Chiou LC, Chang PY, Wu JT. "Urinary 8-OHdG as a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for atherosclerosis and diabetes" *Clinica Chimica Acta*, 339 (2004) 1-9

Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. "Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 4026-37

Xia J, Allenbrand B, Sun GY. "Dietary supplementation of grape polyphenols and chronic ethanol administration on LDL oxidation and platelet function in rats" *Life Sciences*, 63, 5 (1998) 383-90

Xu Z, Hua N, Godber JM. "Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 2077-81

- Yamaguchi Y, Nasu F, Harada A, Kunitomo M. "Oxidants in the gas phase of cigarettes smoke pass through the lung alveolar wall and raise systemic oxidative stress" *Journal of Pharmacological Sciences*, 103,3 (2007) 275-82
- Yamakoshi J, Kataoka S, Koga T, Ariga T. "Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuate the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits" *Atherosclerosis*, 142 (1999) 139-49
- Yang TH, Yang CY, Hu MLL. "Various forms of homocysteine and oxidative status in the plasma of ischemic-stroke patients as compared to healthy controls" *Clinical Biochemistry*, 37 (2004) 494-99
- Yao QH, Mei SR, Weng QF, Zhang PD, Yang Q, Wu CY, Xu GW. "Determination of urinary oxidative DNA damage marker 8-hydroxy-2'-guanosine and the association with cigarette smoking" *Talanta*, 63,3 (2004) 617-23
- Yem TL, Wood RS, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwald D, Shachter NS, Fernandez ML. "Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and post-menopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress" *Journal of Nutrition*, 135 (2005) 1911-17
- Yen GC, Duh PD., Tsai HL. "Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid" *Food Chemistry*, 79 (2002) 307-13
- Yilmaz Y, Toledo R. "Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products" *Food Chemistry*, 93, 2 (2005) 273-78
- Yilmaz Y & Toledo RT. "Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols" *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (2006) 41-48
- Yoshida T, Mori K, Hatano T, Okumura T, Uehara I, Komagoe K, Fujita Y, Okuda T. "Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids.V. Radical scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical". *Chemical Pharmacology Bulletin*, 37 (1989) 1919-21
- Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Corzior A, Sandstrom B, Dragsted LO. "Effect of fruit juice on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidant status" *American Journal of Clinical Nutrition*, 69 (1999) 87-94
- Young JF, Dragsted LO, Daneshvar B, Lauridsen ST, Hansen M, Sandstrom B. "The effect of grape skin extract on oxidative status" *British Journal of Nutrition*, 84 (2000) 505-13
- Young IS. "Oxidative stress and vascular disease: insights from isoprostane measurement" *Clinical Chemistry*, 51, 1 (2005) 14-15
- Yu TW & Ong CN. "Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application and limitation". *Analytical Biochemistry*, 275 (1999) 217-23
- Yu H & Rifai N. "High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerosis: from theory to therapy" *Clinical Biochemistry*, 33, 8 (2000) 601-10
- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M. "Antioxidant properties of hard winter wheat extracts" *Food Chemistry*, 78 (2002a) 457-61
- Yu L, Perret J, Davy B, Wilson J, Melby C L. "Antioxidant properties of cereal products" *Journal of Food Science*, 67, 7 (2002b) 2600-03
- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M. "Free radical scavenging properties of wheat extracts" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002 c) 1619-24

- Yu L, Perret J, Harris M, Wilson J, Haley S. "Antioxidant properties of bran extracts from Akron wheat grown at different locations" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 1566-70
- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M. "Comparison of wheat flours grown at different locations for their antioxidant properties" *Food Chemistry*, 86,1 (2004) 11-16
- Yu L, Zhou K. "Antioxidant properties of bran extracts from Platte wheat grown at different locations" *Food Chemistry*, 90, 1-2 (2005) 311-16
- Yu L, Zhou K, Parry J W. "Inhibitory effects of wheat bran extracts on human LDL oxidation and free radicals" *LWT-Food Science and Technology*, 38 (2005) 463-70
- Yu TW et al "Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and ABTS: rationale, application and limitation" *Analytical Biochemistry*, 275 (1999) 217-23
- Yuan X, Wang J, Yao, H. "Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran" *Food Chemistry*, 90, 4 (2005) 754-64
- Zadch-Nourooz J, Cooper MB, Ziegler D, Betteridge DJ. "Urinary 8-epi-PGF2 $\alpha$  and its endogenous  $\beta$ -oxidation products (2,3-dinos and 2,3-dinos-5,6-dihydro) as biomarkers of total body oxidative stress" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330,3 (2005) 731-36
- Zhai, C.K."Comparative study on nutritional value of Chinese and North American wild rice". *Journal of Food Composition and Analysis*, 14 (2001) 371-82
- Zhang Y, Chen SY, Hsu T, Santella RM. "Immunohistochemical detection of malondialdehyde-DNA adducts in human oral mucosa cells" *Carcinogenesis*, 23,1 (2002) 207-11
- Zhou K, Yu L. "Antioxidant properties of bran extracts from Trego wheat grown at different locations" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004a) 1112-17
- Zhou K, Yu L. "Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation" *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 7 (2004b) 717-21
- Zhou Z, Robards K, Helliwell S, Blanchard C. "The distribution of phenolic acids in rice" *Food Chemistry*, 87, 3 (2004c) 401-06
- Zhou K, Yin JJ, Yu L. "ESR determination of the reactions between selected phenolics acids and free radicals on transition metals" *Food Chemistry*, 95 (2006) 446-57
- Zielinski H. "Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 2008-16
- Zino S, Skeaff M, Williams S, Mann J. "Randomised controlled trial of effect of fruit and vegetable consumption on plasma concentrations of lipids and antioxidants" *British Medical Journal*, 314 (1997) 1787-91
- Zunft HJF, Lüder W, Harde A, Haber B, Graubau HJ, Koebnick C, Grünwald J. "Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholestrol in hypercholesterolemic patients" *European Journal of Clinical Nutrition*, 42,5 (2003) 235-42
- Zupfer JM, Churchill KE, Rasmusson DC, Fulcher RG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1998) 1350-54
-





## **6. APÉNDICE**



---

## Reactivos

---

- Patrones:

- Ácido ascórbico. Panreac 131013
- Ácido cafeico. Sigma, C-0625
- Ácido galacturónico. Sigma 2125
- Ácido ferúlico. Sigma 128708
- Ácido gálico. Sigma, G-7384
- Ácido tánico. Sigma 403040
- Albúmina. Sigma A 8531
- L-arginina. Merck 1542
- Butilhidroxianisol (BHA). Merck 820246
- Catequina. Sigma, C-1251
- L-cisteína. Merck 2838
- Creatinina. Merck 1.05208.0010
- Glucosa. Merck
- Homocisteína. Fluka 53510
- Malvidina-3-O-glucósido. Polyphenols Laboratorios AS, 1601-1
- Neopterina. Fluka 72147
- Pectina de manzana. Fluka 76282
- Quercetina. Sigma 337951
- Rutina. Sigma, R-5143
- TEP (1,1,3,3-tetraetoxipropano). Sigma, T-9889
- L-tirosina. Merck 8371
- DL- $\alpha$ -tocoferol. Sigma 47783
- L-triptófano. Fisher 761186
- Trolox. Aldrich, 23,881-3

- Método Folin:

- Carbonato sódico. Panreac 131648
- Reactivo Folin. Panreac, 251567

- Método FRAP:

- Acetato sódico trihidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). Merck, 6267
- Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Panreac, 141008
- Ácido clorhídrico 35%. Panreac, 131019

- Tricloruro de hierro hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Panreac, 141358
- 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ). Fluka, 93285
- DPPH:
  - Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Aldrich, D21, 140-0
- ORAC:
  - AAPH (2,2'-azobi(2-amidinopropano) dihidrocloruro). Aldrich, 44,091-4
  - Fluoresceína (3,6'-dihidroxi-espiro [isobenzofuran-1 [3H], 9'[9H]-xanthen]-3-ona). Sigma, F-6377M
- ABTS:
  - Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). Fluka, 11557
  - Persulfato potásico ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). Aldrich, 21,622-4
  - Tampón PBS 5mM pH 7,4 (0,145M Na Cl). 0,136 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Panreac, 131509), 0,568 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Panreac, 131679) y 8,48 g de NaCl (Merck, 106404) por litro de tampón.
- Fibra dietética:
  - Ácido 3,5-dinitrosalicílico. Panreac 162837
  - $\alpha$ -amilasa. Sigma, A-3306
  - Amiloglucosidasa. Sigma, A 4915
  - Proteasa. Sigma, P1512
  - Tartrato sódico-potásico tetrahidratado. Panreac 1729
- MDA (Malondialdehído):
  - Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Sigma, T-5500
  - Ácido tricloroacético (TCA). Merck, 100807
  - Ácido trifluoroacético (TFA). Panreac, 363317
  - Butilhidroxitolueno (BHT). Panreac, 162825
  - Hidróxido sódico (NaOH). Panreac, 131687
- Polifenoles totales en orina
  - Carbonato sódico. Panreac, 131648
  - Citrato sódico dihidratado. Merck, 6448
  - Cloruro amónico. Panreac, 131129

- Cloruro cálcico dihidratado. Merck, 2382
  - Cloruro magnésico hidratado. Aldrich, 20,833-7
  - Cloruro potásico. Merck, 4933
  - Cloruro sódico. Panreac, 141659
  - Dihidrógenofosfato de potasio. Merck, 1.04873.0250
  - Reactivo Folin. Panreac, 251567
  - Solución de ácido pícrico. Fluka, 19,737-8-
  - Sulfito sódico. Panreac, 131717
  - Urea. Merck, 18488
- 
- Homocisteína
    - Ácido tricloroacético (TCA). Merck, 100807
    - SBD-F (7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate. Fluka, 46640
    - TCEP (tris-(2-carboxylethyl)-phosphine. Sigma, 124K1214
- 
- Neopterina:
    - $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$  dihidratado, Titriplex III. Merck, 1.08418.0100

## Equipos

---

- Espectrofotómetro UV-Vis de doble haz: Lambda 12, Perkin-Elmer
- Espectrofotómetro UV-Vis de un haz: DU-640, Beckman
- HPLC-1100 Hewlett Packard, con bomba cuaternaria, automuestreador y detector DAD, dotado con una estación de procesamiento de datos HPChem.
- Fluorímetro Perkin-Elmer LS55. Este equipo se unió mediante una interfase al HPLC 1100 para poder ser utilizado también como detector de fluorescencia en HPLC.
- Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-14A, con detector de ionización de llama y autoinyector. Columna capilar, con fase estacionaria polar SP-2330 (30 m \* 0,32 mm \* 0,2 µm) (2-4073 Supelco)
- Sistema de diálisis: se emplea un sistema de renovación continua de agua. El agua se calienta en un baño a 33°C y es impulsada a través de una bomba peristáltica a una cubeta de metacrilato de 43 L de capacidad, donde se mantiene termostatizada a 25° C. El flujo es de 7 L/hora, lo que supone una renovación completa de la diálisis cuatro veces al día.
- Centrífuga refrigerada (Biofuge, Heraeus)
- Liofilizador (Virtis)
- Otros equipos convencionales de laboratorio químico: balanzas, pHmetros, agitadores, baños, estufas, etc.

## Abreviaturas

---

2-AAS: Semialdehído aminoadípico

2-GGS: Semialdehído glutámico

AAPH: 2,2'-azobi(2-amidinopropano) dihidrocloruro

ABAP: 2,2'-azobis-amidinopropano

ABTS: Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AE: Eficacia antirradicálica

ARN: Ácido ribonucleico

BHA: Butilhidroxianisol

BHT: Butilhidroxitolueno

CBA: Ensayo de decoloración de la crocina

CRP: Proteína C reactiva

DMPD: N, N'-dimetil-p-fenilendiamina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FAU: Fibra Antioxidante de Uva

FRAP: Capacidad reductora/antioxidante del hierro

GC: Cromatografía de gases

GGT: gammaglutamiltransferasa

GOT/AST: Transaminasa glutámicooxalacética o Aspartato aminotransferasa

GPT/ALT: Transaminasa Glutámico Piruvica o Alanina aminotransferasa

GSH: Glutathion reducido

GSHPX: Glutathion peroxidasa

GSSG: Glutathion oxidado

HDLs: Lipoproteínas de alta densidad

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

IMC: Índice de masa corporal

LDLs: Lipoproteínas de baja densidad

ms: materia seca

MS: Espectrometría de masas

NADPH: Nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato

ORAC: Capacidad antioxidante de reactivos de oxígeno

PM: Peso molecular

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SBD-F: 7-fluorobenzo-2-oxa-1, 3-diazole-4-sulfonato

SOD: Superóxido dismutasa

SPE: Extracción en fase sólida

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARs: Especies resactivas del ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TCEP: tris-(2-carboxylethyl)-phosphine

TEAC: Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox

TEP: 1,1,3,3-tetraetoxipropano

TFA: Ácido trifluoroacético

TPTZ: 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina

TRAP: Parámetro antioxidante de captura total de radicales

VLDLs: Lipoproteínas de muy baja densidad



## Índice de figuras

1. Esquema de la oxidación de ácidos grasos insaturados.....	1
2. Reacción del $\alpha$ -tocoferol con un radical peroxilo.....	9
3. Estructura general de un flavonoide.....	10
4. Estructuras químicas de algunos carotenoides.....	14
5. Mecanismo de reacción en el método FRAP.....	23
6. Espectro de absorción UV-visible del DMPD <sup>•+</sup> .....	25
7. Evolución de la fluorescencia frente al tiempo en el método TRAP.....	29
8. Reacción entre el MDA y el TBA.....	31
9. Estándares de isoprostanos disponibles comercialmente.....	37
10. Formación del aducto MDA-ADN.....	38
11. Estructura del 2-GGS y del 2-AAS.....	41
12. Estructura de la 3-L-nitrotirosina libre (izquierda) y formando parte de proteínas (derecha).....	42
13. Estructuras del 8-OH Gua (izquierda) y del 8-OHdG (derecha).....	43
14. Esquema de la determinación de capacidad antioxidante a partir de una extracción acuoso-orgánica.....	54
15. Esquema de la determinación de capacidad antioxidante a partir de una extracción fisiológica <i>in vitro</i> .....	55
16. Distribución de los participantes en el estudio sobre los efectos en fumadores de la Fibra Antioxidante de Uva.....	62
17. Parámetros determinados en el estudio del efecto en fumadores de la ingesta de Fibra Antioxidante de Uva.....	63
18. Distribución de los participantes y diseño del ensayo sobre efecto en parámetros de riesgo cardiovascular de la ingesta de Fibra Antioxidante de Uva.....	64
19. Folleto explicativo que se entregó a los voluntarios antes de comenzar el ensayo clínico.....	66
20. Resumen de los parámetros determinados en el estudio sobre los efectos en parámetros de riesgo cardiovascular de la ingesta de Fibra Antioxidante de Uva.....	73
21. Resultados de ABTS para un blanco, una solución de tirosina en agua de 50 ppm y una solución de cisteína en agua de 50 ppm.....	108
22. ORAC, de izquierda a derecha, de un blanco con acetona: agua (50:50 v/v), una solución de tirosina 5 ppm y una solución de triptófano 5 ppm en el mismo medio.....	110
23. Valores de ORAC esperados y experimentales para una solución acuosa de catequina: ácido gálico 5 $\mu$ M: 5 $\mu$ M ("sol pps") mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos.....	111
24. Valores de ORAC esperados y experimentales de una solución en acetona/agua (50:50 v/v) de catequina: ácido gálico 5 $\mu$ M: 5 $\mu$ M mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos.....	112
25. Valores de ABTS esperados y experimentales en agua de una solución de catequina: ácido gálico 125 $\mu$ M: 125 $\mu$ M ("sol pps") mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos.....	114

26. Valores de ABTS esperados y experimentales en acetona/agua (50:50 v/v) de una solución de catequina: ácido gálico 125 $\mu$ M: 125 $\mu$ M ("sol pps") mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos.....	115
27. Curva dosis-respuesta para el ácido gálico y la quercetina frente a % deABTS**remanente.....	123
28. Curva dosis-respuesta para el ácido gálico y quercetina frente a tiempo necesario para alcanzar el equilibrio.....	126
29. Evolución en la absorbancia frente al tiempo tras la reacción del antioxidante sintético con el radical ABTS** (arriba) y con el DPPH* (abajo).....	130
30. Curvas de calibrado de Trolox para los métodos DPPH y ABTS.....	131
31. Resultados del método FRAP al inicio del ensayo en 5 de los participantes.....	146
32. Evolución del ácido úrico plasmático en el grupo experimental y en el grupo control.....	169
33. Evolución en el número semanal de deposiciones tras la ingesta de 7,5 g diarios de FAU en los voluntarios que inicialmente tenían una media de más de 7 deposiciones a la semana (arriba) y en los que inicialmente tenían una media de 8 deposiciones o más a la semana (abajo).....	171
34. Resultados de la encuesta sobre percepción subjetiva de los efectos de la FAU en el transito gastrointestinal al finalizar el estudio.....	172
35. Evolución del % de grasa corporal en el grupo experimental y en el grupo control.....	174
36. Evolución del % de grasa corporal en el grupo experimental en función del sexo, % de grasa inicial y nivel de colesterol inicial.....	175
37. Evolución del colesterol sérico a lo largo del ensayo en el grupo FAU, en el grupo control y en los sujetos normo e hipercolesterolémicos del grupo FAU.....	178
38. Evolución del colesterol LDL a lo largo del ensayo en el grupo FAU, en el grupo control y en los sujetos normo e hipercolesterolémicos del grupo FAU.....	180
39. Evolución de los triglicéridos (mg/ dL) en el grupo FAU y en el grupo control, y en los sujetos hiper- y normocolesterolémicos del grupo FAU.....	182
40. Evolución en el recuento de plaquetas en el grupo FAU, en el grupo control y en el grupo FAU dividido por sexo.....	186
41. Evolución en la proteína C reactiva en los sujetos normograsos e hipergrasos del grupo FAU...	191
42. Representación de los valores de las réplicas para cada uno de los sujetos frente al valor medio de cada sujeto en el método ABTS.....	194
43. Evolución del valor FRAP en el grupo FAU y en el grupo control.....	195
44. Evolución del valor ABTS en el grupo FAU y en el grupo control.....	196
45. Evolución del MDA a lo largo del ensayo en el grupo experimental y en el grupo control.....	200
46 a). Cromatogramas correspondientes a los valores de MDA plasmático de un sujeto del grupo control a lo largo del ensayo: superior, tiempo 0; intermedio, 2 meses; inferior, 3,5 meses.....	201
a). Cromatogramas correspondientes a los valores de MDA plasmático de un sujeto del grupo FAU a lo largo del ensayo: superior, tiempo 0; intermedio, 2 meses; inferior, 3,5 meses.....	202
48. Evolución de la capacidad antioxidante plasmática por el método FRAP (arriba) y ABTS (abajo) en el grupo FAU y en el grupo control.....	204
48. Percepción de las características sensoriales de la FAU al finalizar el ensayo.....	205

## Índice de tablas

1. Alimentos ricos en distintos polifenoles.....	17
2. Características iniciales de la población estudiada.....	69
3. Polifenoles extraíbles de harina y salvado de trigo empleando distintos disolventes de extracción.....	86
4. Contenido en polifenoles extraíbles y capacidad antioxidante asociada en extracciones acuoso-orgánicas de cereales y derivados.....	86
5. Contenido en taninos hidrolizables y capacidad antioxidante asociada en los residuos de las extracciones acuoso-orgánicas de cereales y derivados.....	92
6. Contenido en polifenoles extraíbles y capacidad antioxidante asociada en el sobrenadante de extracciones con enzimas digestivas de cereales y derivados.....	95
7. Contenido en taninos hidrolizables y capacidad antioxidante asociada en los residuos de las extracciones con enzimas digestivas de cereales y derivados.....	97
8. Resultados de los métodos ORAC, ABTS, FRAP y DPPH en una mezcla de catequina: ácido gálico 1M: 1M en distintos disolventes.....	103
9. Pendientes, ordenadas en el origen y $R^2$ para las curvas de calibrado de Trolox ( $y = ax + b$ ) para el FRAP, ABTS y ORAC en distintos solventes.....	106
10. Valores de ORAC, ABTS, FRAP y DPPH para soluciones acuosas de diferentes constituyentes de los alimentos.....	107
11. Valores de ORAC, ABTS, FRAP y DPPH para soluciones en acetona: agua (50:50 v/v) de diferentes constituyentes de los alimentos.....	109
12. Valores de FRAP y DPPH de una solución acuosa de catequina: ácido gálico 125 $\mu$ M: 125 $\mu$ M ("sol pps") mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos.....	116
13. Valores de FRAP y DPPH de una solución en acetona: agua (50:50 v/v) de catequina: ácido gálico 125 $\mu$ M: 125 $\mu$ M ("sol pps") mezclada con diferentes constituyentes de los alimentos.....	118
14. Pendiente, ordenada en el origen y $R^2$ para las curvas ( $y = a + bx$ ) obtenidas para los diferentes antioxidantes, siendo $y$ el porcentaje de radical remanente y $x$ la concentración de antioxidante en la cubeta. ....	123
15. Pendiente, ordenada en el origen y $R^2$ para las curvas ( $y = a + bx$ ) obtenidas para los diferentes antioxidantes, siendo $y$ el porcentaje de radical remanente y $x$ la concentración de antioxidante en la cubeta.....	125
16. Resultados de los métodos ABTS y DPPH medidos a un tiempo fijo, así como eficiencia antioxidante para el ensayo ABTS para los diferentes estándares analizados.....	127
17. Capacidad antioxidante expresada cinéticamente de los métodos ABTS y DPPH de extractos acuoso-orgánicos de muestras ricas en antioxidantes.....	132
18. Composición proximal y compuestos bioactivos de la Fibra Antioxidante de Uva.....	134
19. Azúcares neutros y ácidos urónicos de la Fibra Antioxidante de Uva.....	135
20. Composición porcentual de compuestos polifenólicos de la Fibra Antioxidante de Uva.....	136

21. Capacidad antioxidante asociada a los polifenoles extraíbles y a los taninos condensados de la Fibra Antioxidante de Uva.....	137
22. Resultados de parámetros de estado nutricional para el grupo FAU y el grupo placebo a lo largo del ensayo.....	142
23. Resultados del estudio del metabolismo del hierro para el grupo FAU y el grupo placebo a lo largo del ensayo.....	142
24. Perfil lipídico para el grupo FAU y para el grupo placebo a lo largo del ensayo.....	143
25. Resultados de glucosa plasmática para el grupo FAU y el grupo placebo a lo largo del ensayo.....	145
26. Capacidad antioxidante plasmática para el grupo FAU y el grupo placebo a lo largo del ensayo.....	147
27. MDA plasmático en el grupo FAU y en el grupo placebo a lo largo del experimento.....	148
28. Resumen de los estudios <i>in vivo</i> en animales de los últimos diez años suplementando con uva, vino o subproductos de la elaboración del vino.....	154
29. Resumen de los estudios <i>in vivo</i> en humanos de los últimos diez años suplementando con uva, vino o subproductos de la elaboración del vino.....	158
30. Resumen de estudios <i>in vivo</i> suplementando con distintas fibras insolubles.....	162
31. Evaluación dietética en el grupo experimental y en el grupo control.....	165
32. Evolución en el IMC a lo largo del estudio en el grupo FAU y en el grupo control.....	173
33. Evolución de la glucemia (mg/dL) en el grupo experimental y en el grupo control.....	176
34. Evolución de la hemoglobina glicosilada (en % sobre hemoglobina total) a lo largo del ensayo en el grupo experimental y en el grupo control.....	177
35. Evolución del colesterol HDL (mg/ dL) en el grupo FAU y en el grupo control.....	181
36. Evolución de la P arterial en el grupo FAU y en el grupo control.....	186
37. Evolución de marcadores de inflamación en el grupo FAU y en el grupo control.....	190
38. Valores de $R^2$ para la correlación entre marcadores de inflamación (entre paréntesis, valores de p obtenidos).....	192
39. Valores de polifenoles totales en orina (mg quercetina/g creatinina) determinados por el método Folin en el grupo FAU y en el grupo control.....	198

## Publicaciones y trabajos presentados en congresos

---

### Trabajos publicados

2005 Pérez-Jiménez J & Saura-Calixto F. "Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (2005) 5036-40

2006 Pérez-Jiménez J & Saura-Calixto F. "Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays". Food Research International, 39 (2006) 791-800

### Trabajos en prensa

Pérez-Jiménez J & Saura-Calixto F. "Antioxidant activity of dietary polyphenols: a kinetic expression of the ABTS assay" International Journal of Food Science and Technology

### Trabajos enviados

Pérez-Jiménez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio ME, García-Diz, Goñi I, Saura-Calixto F. "Grape Antioxidant Dietary Fibre supplementation and its effects in Cardiovascular Disease Risk Factors. Effects on serum lipid profile, blood pressure, anthropometric pre-prandial glucose and glycosilated haemoglobin"

### Trabajos en elaboración

Pérez-Jiménez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio ME, García-Diz, Goñi I, Saura-Calixto F. "Effects on plasmatic antioxidant capacity after and acute and a chronic intake of Grape Antioxidant Dietary Fiber"

Posters en congresos

2005 II International Congress on Antioxidants and Methods. Orlando, Florida, EEUU, 22- 24 junio:

- Jara Pérez-Jiménez & Fulgencio Saura-Calixto "Antioxidant test methods may underestimate the actual antioxidant capacity of foods: I. Cereals"

- Antonio Jiménez-Escrig, Jara Pérez-Jiménez y Fulgencio Saura-Calixto. "Some limitations of the modified Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-FL) assay"

Comunicaciones en congresos

2006 First International Symposia About Pharmacology of Natural Products and BLACPM, Varadero, Cuba, 20-24 noviembre:

- Saura-Calixto FD, Goñi I, Serrano J, Pérez-Jiménez J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio ME. "Antioxidant dietary fibre: a potential tool for prevention of oxidative stress associated disease". Resumen publicado en Revista Cubana de Farmacología, 40, 12 (2006) 34

2007 V Congreso de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. Tecnología, Calidad y Seguridad Hortofrutícola. Cartagena, España, 29 de mayo- 1 de junio:

- Pérez-Jiménez J & Saura-Calixto F. "Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas"



